

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTIANO ÁLVARES DE ARAÚJO

**MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM CARRAGENANAS: ESTUDO COMPARATIVO
DE DIVERSOS PADRÕES DE SULFATAÇÃO NA ATIVIDADE
ANTICOAGULANTE**

CURITIBA

2012

CRISTIANO ÁLVARES DE ARAÚJO

**MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM CARRAGENANAS: ESTUDO COMPARATIVO
DE DIVERSOS PADRÕES DE SULFATAÇÃO NA ATIVIDADE
ANTICOAGULANTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, ao Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Diogo R. Bazan Ducatti
Co-orientadores: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá e Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

CURITIBA

2012

CRISTIANO ÁLVARES DE ARAÚJO

**MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM CARRAGENANAS: ESTUDO COMPARATIVO
DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE EM DIVERSOS PADRÕES DE
SULFATAÇÃO**

Dissertação aprovada como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.



Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti (Orientador)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dra. Juliana Emanuela Fogari Cassolato

Grupo Educacional UNINTER



Prof. Dra. Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Curitiba, 23 de fevereiro de 2012

Dedico essa Dissertação aos meus queridos pais, Gerson e Telma, pelo amor incondicional e doação de uma vida inteira aos seus filhos. Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos da minha família de Natal, em especial às minhas irmãs Goretti e Verônica, e ao meu irmão Cristovam. Maninhos, apesar da distância tenho vocês sempre em meu pensamento, todos os dias.

Agradeço a minha família de Curitiba, em especial ao Alberto, Antônio e Eloísa. Muito obrigado pelo apoio, companheirismo e paciência. A minha querida tia Rosi pelo carinho e acolhida sempre agradável em sua casa. Ao meu cunhado Robson e sua esposa Eliane (valeu pela convivência dos últimos anos e pela hospedagem nos meus últimos dias em Curitiba). Aos grandes amigos Lindóia, Marie Isabelle e Alysson. Ter a oportunidade de conviver com vocês nesses últimos anos foi um grande presente. Aos primos Giovani e Ioná pelos agradáveis momentos de convivência. A Marise, Wálter, Nayara e Felipe. Muito obrigado por me acolherem como família. A Márcia Roza pelo carinho e consideração que você tem por mim.

Um agradecimento muito especial ao meu orientador, Prof. Dr. Diogo Ducatti, por contribuir com sua sapiência na minha busca pelo conhecimento durante todo o curso e também por sua paciência nos momentos mais difíceis e decisivos ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Agradeço ao Prof. Dr. Thales Cipriani pela orientação, disponibilidade na condução dos ensaios de atividade anticoagulante e discussão dos resultados. Agradeço também pela valiosa ajuda na condução da coleta de sangue para os experimentos.

Agradeço a banca examinadora composta pelas Professoras Dr^a Carmen Lúcia Petkowicz de Oliveira e Dr^a Juliana Emanuela Fogari Cassolato, pelas observações e sugestões ao trabalho durante a arguição.

A Prof^a Dra. Maria Eugênia Nosedá pela correção do projeto, avaliação dos seminários e conselhos na condução das minhas apresentações, além da amizade e carinho que sinto por você. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Miguel Nosedá pela colaboração no projeto, avaliação dos seminários e pela maneira séria e comprometida com que conduz o programa de pós-graduação em Ciências-Bioquímica.

Ao Prof. Dr. Alan Gonçalves pela colaboração na discussão do artigo e pelas dicas em momentos de dúvidas durante os experimentos, além da agradável companhia em nosso laboratório.

A Prof^a Dra. Juliana Maurer pela amizade e oportunidade de acompanhá-la na disciplina de Bioquímica II, como estagiário. Aprendi muito contigo! Agradeço também pela disponibilidade de acesso ao laboratório e uso dos equipamentos, sem esquecer os momentos de descontração durante o “papo no cafezinho”.

A Prof^a. Dra. Selma Baggio pela amizade e disponibilização do laboratório.

A Prof^a Elaine Benelli pela atenção e ensinamentos quando estávamos juntos na disciplina de aulas práticas. Muito obrigado!

Aos demais professores que contribuíram de maneira direta ou indireta com a minha formação durante esses dois anos.

Um agradecimento muito especial ao Doutorando Luciano Campestrini. Mongo, sem a sua disponibilidade eu não iria muito longe. A lista de benesses é um saco sem fundo, afinal você me ajudou com o Top Spin, nas análises de infravermelho, no HPSEC-MALLS, instalação de programas, me emprestou material de laboratório, assistiu aos meus seminários e por aí vai. Mas a principal é a amizade que cultivamos nesses dois anos. Muito obrigado.

A ex-aluna de doutorado Rosecler Machado, pela introdução ao laboratório, material bibliográfico, espaço na bancada e material de laboratório herdado, mas principalmente pela amizade que cultivamos. Muito obrigado! Sinto muito a sua falta!

A Doutoranda Tatiane Winkler pela amizade, conselhos e pelas análises de RMN. Muito obrigado!

A Doutoranda Siliane Berte pela amizade, material emprestado e pelas boas risadas no anexo.

Aos colegas de turma, em especial a Ana Paula Brandt que compartilhou comigo uma pós-graduação na PUC, mas principalmente estava comigo na agonia do processo de seleção e nivelamento.

Aos colegas do núcleo de carboidratos Louise Provin, Adamara Machado, Jennifer Mota, Pauline Nosatto, Gilda Mogor, Nessana Dartora, Mariana e Diego, pela troca de idéias, cumplicidade e bons momentos de descontração vividos.

As minhas colegas do laboratório de síntese de carboidratos Íris, Stephanie e Juliana Cunico pelos momentos de descontração, almoços no RU e colaboração mútua durante os experimentos.

Agradeço a Elizângela pela disponibilidade em realizar as análises de homogeneidade e dn/dc.

Agradeço a D. Irene pela atenção e disponibilidade.

Agradeço a D. Rose Prado pela atenção, simpatia e acesso a centrífuga da Biomol.

Finalmente agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica e ao CAPES/REUNI pelo financiamento do projeto.

A sabedoria não se transmite, é preciso que nós a descubramos fazendo uma caminhada que ninguém pode fazer em nosso lugar e que ninguém nos pode evitar, porque a sabedoria é uma maneira de ver as coisas. (Marcel Proust)

RESUMO

Entre os polissacarídeos sintetizados pela parede celular das algas vermelhas estão as galactanas sulfatadas (agaranas e carragenanas). Este trabalho teve como objetivo principal modificar quimicamente a estrutura das carragenanas *kappa*, *iota* e *theta*, através de sulfatações seletivas e persulfatação, para a realização de um estudo comparativo de atividade anticoagulante. As carragenanas *kappa*, *iota* e *lambda* foram extraídas a quente, das algas *Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum* e *Gigartina skottsbergii*, respectivamente. Após a extração, os polissacarídeos foram precipitados com 3 volumes de etanol. Os polissacarídeos de *Kappaphycus alvarezii* (K) foram submetidos a tratamento com KCl 0,1 M para a separação da *kappa*-carragenana, gerando a fração K-01; os de *Eucheuma denticulatum* (E) foram submetidos a tratamento alcalino para a ciclização das unidades D2S,6S, pertencentes ao precursor *nu*-carragenana, em DA2S da *iota*-carragenana, gerando a fração IC; os de *Gigartina skottsbergii* (G) foram submetidos a tratamento com KCl 0,8 M, para a separação da *lambda*-carragenana (G-08), e em seguida a um tratamento alcalino para a ciclização das unidades D2S,6S de *lambda*-, em DA2S de *theta*-carragenana, gerando a fração TC. A fração K-01(G4S-DA) foi submetida à sulfatação seletiva em C6, produzindo a fração K-016S com 55% da díade G4S,6S-DA e grau de sulfatação 2,0. Em outro procedimento de sulfatação seletiva, a fração K-01 foi submetida previamente a uma esterificação com o grupo pivalóila para a proteção da hidroxila de C6, produzindo a fração K-01E. Em seguida essa fração foi sulfatada e tratada com NaOH para a desproteção da hidroxila de C6, produzindo a fração K-01ES constituída de 40% da díade G2S,4S-DA2S e grau de sulfatação 3,2. A fração K-01 foi submetida a uma persulfatação, produzindo a fração K-01OS, constituída por 81% da díade G2S,4S,6S-DA2S e grau de sulfatação 3,8. A fração K-01 foi dessulfatada, produzindo a fração KD constituída por 78% da díade G-DA e grau de sulfatação 0,14. A fração KD foi submetida à sulfatação seletiva em C6, gerando a fração KD-6S (G6S-DA). A fração IC (G4S-DA2S) foi submetida à sulfatação seletiva em C6, produzindo a fração IC-6S constituída por 73% da díade G4S,6S-DA2S e grau de sulfatação de 2,4. A fração TC foi submetida à sulfatação seletiva em C6, produzindo a fração TC-6S constituída por 33% da díade G2S,6S-DA2S e grau de sulfatação de 2,6. A atividade anticoagulante das frações nativas e das modificadas quimicamente foram avaliadas *in vitro* através do teste de tromboplastina parcial ativada (APTT). Todas as frações modificadas quimicamente apresentaram atividade anticoagulante dose-dependente, superior à das frações nativas, exceto a KD que foi submetida a um processo de dessulfatação. Para se ter um grande efeito anticoagulante, sem efeito pró-coagulante, são necessários grupos sulfato adequadamente posicionados em C2, C4 e C6 da unidade de β -D-galactopiranosose e em C2 da unidade de 3,6- α -D-anidrogallactopiranosose. A fração K-01OS possui estes requisitos e exibiu o maior efeito anticoagulante entre todas as frações.

Palavras-chave: Polissacarídeos. Galactanas sulfatadas. Carragenanas. Sulfatação seletiva. Persulfatação. Atividade anticoagulante.

ABSTRACT

Among the polysaccharides synthesized by cell walls of red algae are the sulfated galactans (carrageenans and agarans). The aim of this work is to chemically modify the structure of *kappa*-, *iota* and *theta*-carrageenan, using a methodology of selective sulfation and oversulfation. The modified molecules were tested in a trial of anticoagulant activity. These algae were extracted from *Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum* and *Gigartina skottsbergii*, respectively. After extraction, the polysaccharides were precipitated with 3 volumes of ethanol. The polysaccharides of *Kappaphycus alvarezii* (K) were treated with KCl 0.1 M for the separation of *kappa*-carrageenan, getting a fraction named K-01; those of *Eucheuma denticulatum* (E) were subjected to alkaline treatment for cyclization of the units D2S,6S, belonging to the precursor *nu*-carrageenan, in DA2S of *iota*-carrageenan. This procedure yielded a fraction named IC; and the polysaccharides of *Gigartina skottsbergii* (G) were treated with KCl 0.8 M for the separation of *lambda*-carrageenan (G-08) and then to an alkaline treatment for the cyclization of units D2S,6S of *lambda*-, in DA2S of *theta*-carrageenan, generating a fraction named TC. K-01 (G4S-DA) was submitted to selective sulfation at C6, producing K-016S with 55% yield in the dyad G4S,6S-DA and with degree of sulfation around 2.0. In another procedure for selective sulfation, K-01 was submitted prior to an esterification reaction with pivaloyl for protection of the C6 hydroxyl, producing a fraction named K-01E. Then this fraction was over sulfated and treated with NaOH for elimination of pivaloyl, producing the fraction K-01ES, comprised 40% yield of the dyad G2S,4S-DA2S and degree of sulfation 3.2. K-01 was submitted to a oversulfation, producing K-01OS, consisting for 81% yield of dyad G2S,4S,6S-DA2S and degree of sulfation 3.8. K-01 was desulfated, producing a fraction named KD, consisting of 78% yield of the dyad G-DA and degree of sulfation 0.14. KD was subjected to selective sulfation at C6, generating a fraction named KD-6S (G6S-DA). IC (G4S-DA2S) underwent selective sulfation at C6 of G4S, producing IC-6S fraction consisted of 73% yield of the dyad G4S,6S-DA2S and degree of sulfation of 2.4. TC was subjected to selective sulfation at C6 of G2S, producing TC-6S, comprises 33% yield of the dyad G2S,6S-DA2S and degree of sulfation 2.6. The anticoagulant effects of native and chemically modified fractions were evaluated, *in vitro*, by activated partial thromboplastin time (APTT) test. All chemically modified fractions exhibited dose-dependent anticoagulant effect, higher than native, except for the KD, which was submitted to a desulfation process. To have a high anticoagulant effect, without pro-coagulant effect, sulfate groups suitably positioned in C2, C4 and C6 of the unit of β -D-galactopyranose and in C2 of the unit of 3,6- α -D-anidrogallactopiranoside are needed. The K-01OS fraction exhibited the highest anticoagulant effect of all fractions.

Key-words: Polysaccharides. Sulfated galactans. Carrageenans. Selective sulfation. Over sulfation. Anticoagulant effect.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURAS DISSACARÍDICAS BÁSICAS DAS GALACTANAS EXTRAÍDAS DAS ALGAS VERMELHAS	27
FIGURA 2 - MECANISMO CLÁSSICO DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA PROPOSTO POR MORAWITZ, 1905.....	33
FIGURA 3 - VIA EXTRÍNSECA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	34
FIGURA 4 - VIA INTRÍNSECA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	35
FIGURA 5 - VIA FINAL COMUM DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	36
FIGURA 6 - DOMÍNIOS INIBITÓRIOS DO TFPI (K1, K2 e K3) E SUAS MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO	37
FIGURA 7 - ANTITROMBINA E SEUS LIGANTES.....	38
FIGURA 8 - COFATOR II DA HEPARINA (HCII) E SEUS LIGANTES	38
FIGURA 9 - SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA.....	40
FIGURA 10 - EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE <i>Kappaphycus alvarezii</i> E SEPARAÇÃO DAS CARRAGENANAS POR TRATAMENTO COM CLORETO DE POTÁSSIO	60
FIGURA 11 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN ¹ H DA FRAÇÃO K (D) E SEUS PRODUTOS DE PRECIPITAÇÃO APÓS TRATAMENTO COM KCl	62
FIGURA 12 - EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DA ALGA <i>Eucheuma denticulatum</i> E TRATAMENTO ALCALINO PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO IC	63
FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN ¹ H DA FRAÇÃO IC (B) OBTIDA ATRAVÉS DE TRATAMENTO ALCALINO DA FRAÇÃO E (A)	64
FIGURA 14 - REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO DAS UNIDADES D2S,6S DAS DÍADES DE NU-CARRAGENANA PRESENTES NA FRAÇÃO E PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO IC	65

FIGURA 15 - EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE <i>Gigartina skottsbergii</i> (G), SEPARAÇÃO DA LAMBDA-CARRAGENANA (G-08) COM CLORETO DE POTÁSSIO E TRATAMENTO ALCALINO PARA OBTENÇÃO DE THETA-CARRAGENANA (TC)	66
FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO TC (A) OBTIDA A PARTIR DO TRATAMENTO ALCALINO DA FRAÇÃO G-08 (B).....	67
FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO TC OBTIDA APÓS TRATAMENTO ALCALINO DA FRAÇÃO G-08.....	68
FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO TC	69
FIGURA 19 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO TC.....	70
FIGURA 20 - ESQUEMA DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM K-01 (1) PARA OBTENÇÃO DE SEUS PRODUTOS DE SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 (3 E 7); SULFATAÇÃO SELETIVA EM C2 (4 E 5); PERSULFATAÇÃO (2) E DESSULFATAÇÃO (6)	72
FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN ^1H DA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 E PERSULFATAÇÃO DE K-01	74
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA REAÇÃO PREPARATIVA PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01OS (A) A PARTIR DA PERSULFATAÇÃO DE K-01 (B)...	76
FIGURA 23 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN ^{13}C DEPT (A) E ^{13}C (B) DA FRAÇÃO K-01OS OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DE K-01 (C)	77
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO K-01OS	78
FIGURA 25 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO K-01OS.....	79
FIGURA 26 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES K-01 (A) E K-01OS (B)	80
FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO K-016S (A) OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DE K-01 (B)	81
FIGURA 28 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DEPT (A) E ^{13}C (B) DE K-016S OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DE K-01 (C)	82

FIGURA 29 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO K-016S	82
FIGURA 30 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC (ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES K-01 (A) E K-016S (B) .	84
FIGURA 31 - ESPECTROS DE RMN ^1H DA OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM K-01	87
FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO K-01E OBTIDA A PARTIR DA ESTERIFICAÇÃO SELETIVA EM C6 DE K-01	88
FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO K-01E.....	89
FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN HMBC DE K-01E	89
FIGURA 35 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO K-01ES OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE C2 (UNIDADES G4S E DA) DA FRAÇÃO K-01E	90
FIGURA 36 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO K-01ES OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE K-01E.....	91
FIGURA 37 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC (ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES K-01 (A) E K-01ES (B).	92
FIGURA 38 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC (ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES K-01 (A) E KD (B)	93
FIGURA 39 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO KD OBTIDA ATRAVÉS DE DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA FRAÇÃO K-01.....	94
FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO KD (A) COMPARADA COM A FRAÇÃO K-01 (B).....	95
FIGURA 41 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO KD (EM PRETO) COMPARADO COM A FRAÇÃO K-01 (EM VERMELHO)	95
FIGURA 42 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO KD-6S (A) OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO KD (B)	97

FIGURA 43 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DEPT (A) E ^{13}C (B) DA FRAÇÃO KD-6S OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE C6 DA FRAÇÃO KD (A).....	97
FIGURA 44 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC (ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES KD (A) E KD-6S (B).....	98
FIGURA 45 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DA FRAÇÃO IC (<i>IOTA</i> -CARRAGENANA) ATRAVÉS DE TRATAMENTO ALCALINO DA FRAÇÃO E. SULFATAÇÃO SELETIVA DE C6 DA FRAÇÃO IC PARA OBTENÇÃO DE SEU DERIVADO QUIMICAMENTE MODIFICADO IC-6S.....	99
FIGURA 46 - ESPECTROS DE RMN ^1H DOS PRODUTOS OBTIDOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE REAÇÃO PARA A OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO IC	101
FIGURA 47 - ESPECTROS DE RMN ^1H DA FRAÇÃO IC-6S (B) OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE C6 DA FRAÇÃO IC (A)	102
FIGURA 48 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DEPT (A) E ^{13}C (B) DA FRAÇÃO IC-6S OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE C6 DA FRAÇÃO IC (C).....	103
FIGURA 49 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO IC-6S.....	104
FIGURA 50 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO IC-6S	105
FIGURA 51 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC (ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES IC (A) E IC-6S (B).....	106
FIGURA 52 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DA FRAÇÃO TC (<i>THETA</i> -CARRAGENANA) ATRAVÉS DO TRATAMENTO ALCALINO DA FRAÇÃO G-08. SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO TC PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO TC-6S..	107
FIGURA 53 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE SULFATAÇÃO SELETIVA DE C6 DA FRAÇÃO TC PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO TC-6S.....	108
FIGURA 54 - ESPECTRO DE RMN HSQC DE TC-6S	109

FIGURA 55 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC (ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES TC (A) E TC-6S (B) ...	111
FIGURA 56 - CONCENTRAÇÃO NECESSÁRIA PARA DOBRAR O VALOR NORMAL DO APTT EM FUNÇÃO DO GRAU DE SULFATAÇÃO (DS)	114
FIGURA 57 - CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO NECESSÁRIA PARA DOBRAR O VALOR NORMAL DO APTT (CN2APTT).....	115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM O PADRÃO DE SULFATAÇÃO DA UNIDADE A	30
TABELA 2 - ASSINALAMENTOS DE RMN ^1H E ^{13}C DA FRAÇÃO TC, OBTIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE POR HSQC	69
TABELA 3 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PERSULFATAÇÃO E SULFATAÇÃO SELETIVA DA FRAÇÃO K-01	73
TABELA 4 - ASSINALAMENTOS DE RMN ^1H E ^{13}C DA PRINCIPAL DÍADE PRESENTE NAS FRAÇÕES K-01OS, K-016S, K-01E E K-01ES, OBTIDOS ATRAVÉS DE RMN POR HSQC	83
TABELA 5 - ESTIMATIVA DAS DÍADES PRESENTES NAS FRAÇÕES K-01OS E K-016S, GRAU DE SULFATAÇÃO (DS) E MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M_w)	84
TABELA 6 - OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DA FRAÇÃO K-01 PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01E.....	85
TABELA 7 - ESTIMATIVA DAS DÍADES PRESENTES NA FRAÇÃO K-01ES, GRAU DE SULFATAÇÃO (DS) E MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M_w).....	92
TABELA 8 - ESTIMATIVA DAS DÍADES PRESENTES NAS FRAÇÕES KD E KD-6S, GRAU DE SULFATAÇÃO (DS) E MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M_w)..	98
TABELA 9 - OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO IC PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO IC-6S	100
TABELA 10 - ESTIMATIVA DAS DÍADES PRESENTES NA FRAÇÃO IC-6S, GRAU DE SULFATAÇÃO (DS) E MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M_w) ...	104
TABELA 11 - ASSINALAMENTOS DE RMN ^1H E ^{13}C DA PRINCIPAL DÍADE PRESENTE NA FRAÇÃO IC-6S, OBTIDOS ATRAVÉS DE RMN POR HSQC	105
TABELA 12 - OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE SULFATAÇÃO SELETIVA NA FRAÇÃO TC PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO TC-6S	108

TABELA 13 - ASSINALAMENTOS DE RMN ^1H E ^{13}C DA PRINCIPAL DÍADE PRESENTE NA FRAÇÃO TC-6S, OBTIDOS ATRAVÉS DE RMN POR HSQC.....	110
TABELA 14 - ESTIMATIVA DAS DÍADES PRESENTES NA FRAÇÃO TC-6S, GRAU DE SULFATAÇÃO (DS) E MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M_w) ...	110
TABELA 15 - ENSAIO DE APTT DAS FRAÇÕES NATIVAS (K-01, IC E TC) E MODIFICADAS QUIMICAMENTE (K-016S, K-01OS, K-01ES, KD, KD-6S, IC-6S E TC-6S).....	112

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2M2B	- 2-metil-2-buteno
APTT	- tempo de tromboplastina parcial ativada
AT	- antitrombina
CN2APTT	- concentração necessária para dobrar o valor normal do APTT
COSY	- <i>correlation spectroscopy</i>
D ₂ O	- óxido de deutério (água deuterada)
DEPT	- <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMFa	- dimetil formamida anidra
DMSO	- dimetil sulfóxido
DS	- grau de sulfatação
E	- fração polissacarídica obtida da extração da alga <i>E. denticulatum</i>
G	- fração polissacarídica obtida da extração da alga <i>G. skottsbergii</i>
G-08	- fração obtida através da separação de G com KCl
HCII	- cofator II da heparina
HMBC	- <i>heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy</i>
HMWK	- cininogênio de alto peso molecular
HPSEC	- cromatografia de exclusão estérica de alta pressão
HSQC	- <i>heteronuclear single quantum correlation spectroscopy</i>
IC	- fração obtida após o tratamento alcalino da fração E
IC-6S	- fração obtida após a sulfatação seletiva da fração IC
K	- fração polissacarídica obtida após a extração da alga <i>K. alvarezii</i>

K-01	- <i>kappa</i> -carragenana obtida após o tratamento da fração K com cloreto de potássio 0,1 M
K-016S	- fração obtida após a sulfatação seletiva em C6 de K-01
K-01E	- fração obtida após esterificação em C6 de K-01 com cloreto de pivaloíla
K-01ES	- fração obtida após a sulfatação seletiva em C2 de K-01E
K-01OS	- fração obtida após a persulfatação de K-01
K-01T	- fração K-01 na forma de sal de trietilamônio
K-05	- fração obtida após o tratamento de K com cloreto de potássio 0,5 M
K-2	- fração obtida após o tratamento de K com cloreto de potássio 2,0 M
KCl	- cloreto de potássio
KD	- fração obtida após dessulfatação de K-01
KD-6S	- fração obtida após a sulfatação seletiva em C6 de KD
kDa	- kilodaltons
KOH	- hidróxido de potássio
LMWH	- heparina de baixo peso molecular
NaBH ₄	- boroidreto de sódio
NaN ₃	- azida de sódio
NaNO ₂	- nitrito de sódio
NaOH	- hidróxido de sódio
nd	- não detectado
pivCl	- cloreto de pivaloíla
ppm	- partes por milhão
PT	- tempo de protrombina

RMN	- ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	- ressonância magnética nuclear de hidrogênio um
RMN ¹³ C	- ressonância magnética nuclear de carbono treze
RPM	- rotações por minuto
SDS	- lauril sulfato de sódio
SO ₃ Me ₃ N	- complexo trióxido de enxofre trimetil amina
SO ₃ -Py	- complexo trióxido de enxofre piridina
TC	- fração obtida após tratamento alcalino de G-08
TC-6S	- fração obtida após sulfatação seletiva em C6 da fração TC
TC-T	- fração TC na forma de sal de trietilamônio
TFPI	- inibidor da via do fator tissular
TT	- tempo de trombina
UFH	- heparina não fracionada
δ	- deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 ALGAS VERMELHAS	25
2.2 GALACTANAS SULFATADAS	26
2.3 CARRAGENANAS	27
2.3.1.1 ESTRUTURA, CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DAS CARRAGENANAS	28
2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	30
2.4.1 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS GALACTANAS SULFATADAS	31
2.5 HEMOSTASIA	32
2.6 COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	33
2.6.1 VIA EXTRÍNSECA OU VIA DO FATOR TISSULAR	34
2.6.2 VIA INTRÍNSECA OU VIA DO CONTATO	35
2.6.3 VIA FINAL COMUM	36
2.7 REGULAÇÃO DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	36
2.7.1 INIBIDOR DA VIA DO FATOR TISSULAR (TFPI)	37
2.7.2 ANTITROMBINA (AT)	37
2.7.3 COFATOR II DA HEPARINA (HCII)	38
2.8 HEPARINAS	39
2.9 SULFATAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS	41
2.9.1 PRINCIPAIS AGENTES SULFATANTES	41
3 JUSTIFICATIVA	45
4 OBJETIVOS	46
4.1 OBJETIVO GERAL	46
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
5 MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1 ALGAS PRODUTORAS DE CARRAGENANAS: OBTENÇÃO E EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	48
5.1.1 <i>Kappaphycus alvarezii</i>	48
5.1.2 <i>Eucheuma denticulatum</i>	49
5.1.3 <i>Gigartina skottsbergii</i>	50
5.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM KAPPA-CARRAGENANA (K-01)	51
5.2.1 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-016S ATRAVÉS DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE K-01	51
5.2.2 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01OS ATRAVÉS DA PERSULFATAÇÃO DE K-01	51
5.2.3 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01ES ATRAVÉS DA ESTERIFICAÇÃO E SULFATAÇÃO SELETIVA DE K-01	52
5.2.4 DESSULFATAÇÃO DE K-01 PARA FORMAÇÃO DA FRAÇÃO KD E OBTENÇÃO DA FRAÇÃO KD-6S ATRAVÉS DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE KD	53
5.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM IOTA-CARRAGENANA (IC)	54
5.3.1 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO IC-6S ATRAVÉS DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE IC	54
5.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM THETA-CARRAGENANA (TC)	54
5.4.1 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO TC-6S ATRAVÉS DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE TC	54
5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS	55
5.5.1 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SULFATAÇÃO (DS)	55

5.5.2 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) DIFERENCIAL E ESPALHAMENTO DE LUZ EM MULTIÂNGULOS (MALLS).....	56
5.6 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	57
5.6.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	57
5.6.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .	57
5.7 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>in vitro</i>	58
5.7.1 TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (APTT)	58
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
6.1 EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DA ALGA <i>Kappaphycus alvarezii</i> E SEPARAÇÃO DA KAPPA-CARRAGENANA POR TRATAMENTO COM CLORETO DE POTÁSSIO.....	59
6.2 EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DA ALGA <i>Eucheuma denticulatum</i> E TRATAMENTO ALCALINO PARA OBTENÇÃO DE IOTA-CARRAGENANA (IC)	62
6.3 EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DA ALGA <i>Gigartina skottsbergii</i> , SEPARAÇÃO DA LAMBDA-CARRAGENANA POR TRATAMENTO COM CLORETO DE POTÁSSIO E TRATAMENTO ALCALINO PARA OBTENÇÃO DE THETA-CARRAGENANA (TC)	65
6.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM KAPPA-CARRAGENANA (K-01)	70
6.4.1.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SULFATAÇÃO DA FRAÇÃO K-01 PARA A OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES K-01OS E K-016S.....	73
6.4.3 OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DA FRAÇÃO K-01 PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01E	85
6.4.4 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01E PREPARATIVA, UTILIZANDO A MELHOR CONDIÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM C6	87
6.4.5 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01ES A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA EM C2 (UNIDADES G4S E DA) DA FRAÇÃO K-01E	90
6.4.6 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO KD ATRAVÉS DA DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA FRAÇÃO K-01.....	92
6.4.7 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO KD-6S ATRAVÉS DA SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO KD	96
6.5 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM IOTA-CARRAGENANA (IC).....	99
6.5.1 OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO IC PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO IC-6S.....	100
6.6 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM THETA-CARRAGENANA (TC)	106
6.6.1 OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO TC PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO TC-6S	107
6.7 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>IN VITRO</i>	111
7 CONCLUSÕES.....	117
REFERÊNCIAS.....	119

1 INTRODUÇÃO

As algas vermelhas (*Rhodophyta*) são a principal fonte não-animal de polissacarídeos sulfatados encontrada na natureza. Seus principais produtos de extração são as galactanas sulfatadas (agaranas e carragenanas), largamente exploradas comercialmente pelas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, em virtude de suas propriedades geleificantes e viscosificantes. Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado que além das propriedades físico-químicas, esses biopolímeros exibem valioso potencial farmacológico, com destaque para as atividades antioxidante (ZHANG *et al.* 2010), antitumoral (ZHOU *et al.* 2006), antiviral (DUARTE *et al.* 2004; TALARICO *et al.* 2007), e anticoagulante (FARIAS *et al.* 2000; SILVA *et al.* 2010). O tipo de atividade biológica e as propriedades físico-químicas atribuídas às galactanas sulfatadas estão intrinsecamente relacionados às suas características estruturais, como por exemplo, o padrão de substituição por grupos éster sulfato, que lhes confere caráter aniônico, favorecendo a sua interação com moléculas carregadas positivamente como proteínas, proteoglicanas e ácidos nucléicos (KRENTSEL *et al.* 1997). Variações na massa molecular, no tipo de ligação glicosídica e no posicionamento dos grupamentos sulfato também contribuem para o aumento da atividade biológica ou para a melhoria das propriedades físico-químicas relacionadas a estes polímeros.

Dentre as diferentes atividades biológicas relatadas para estes polissacarídeos, a atividade anticoagulante é uma das mais pesquisadas em virtude da busca por um substituto para a heparina, polissacarídeo sulfatado com atividade anticoagulante, amplamente utilizado na prevenção e tratamento de trombose venosa, que tem seu uso limitado por causar efeitos indesejáveis em seus usuários, além do risco de contaminação viral devido a sua origem animal (MESTECKINA; SHCHERBUKHIN, 2010). Essa busca abriu um novo campo de pesquisa na área de síntese de carboidratos e as galactanas sulfatadas apresentam inúmeras vantagens como a sua abundância na natureza, a diversidade de padrões estruturais, a extração em meio aquoso através de metodologias simples, sem agressão ao meio ambiente e a um baixo custo, além de serem isentos de patógenos animais.

Diante disso, a proposta desse trabalho foi extrair e purificar a *kappa*-, a *iota*- e a *lambda*-carragenana, obtidas das espécies de algas vermelhas *Kappaphycus*

alvarezii, *Eucheuma denticulatum* e *Gigartina skottsbergii*, respectivamente, e promover modificações químicas em suas moléculas, através de reações de sulfatação regiosseletivas e persulfatação, com o intuito de obter, em laboratório, novas estruturas com diferentes graus de sulfatação e posicionamento do grupamento sulfato para em seguida realizar um estudo comparativo da atividade anticoagulante, *in vitro*, entre as estruturas nativas e quimicamente modificadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALGAS VERMELHAS

As algas são organismos tipicamente aquáticos e com estrutura menos complexa do que as plantas superiores (GRAHAM; WILCOX, 2000), estando largamente distribuídas no ambiente, em especial no habitat marinho. Elas representam um grupo abrangente de organismos fotossintetizadores e avasculares, que não apresenta órgãos nem sistemas especializados e possui suas estruturas reprodutivas desprotegidas (criptogamia), além de serem desprovidas de flores e sementes (SOUTH; WHITTICK, 1987). Por não apresentarem uma estrutura vegetal diferenciada em raiz, caule e folhas, são denominadas talófitas ou plantas inferiores (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1989).

As três principais divisões de macroalgas marinhas são a *Phaeophyta* (algas marrons), *Chlorophyta* (algas verdes) e *Rhodophyta* (algas vermelhas) que juntas compreendem 7000 espécies (RORRER; CHENEY, 2004). A parede celular dessas espécies é constituída por dois componentes principais: um fibrilar que forma o esqueleto da parede e um amorfo que constitui a matriz. A matriz pode compreender até 70% do peso seco da parede celular e geralmente possui uma composição variada de polissacarídeos sulfatados como os alginatos nas algas marrons e agaranas e carragenanas nas algas vermelhas, correspondendo aos principais polissacarídeos de algas, comercialmente explorados (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; LEE, 1989).

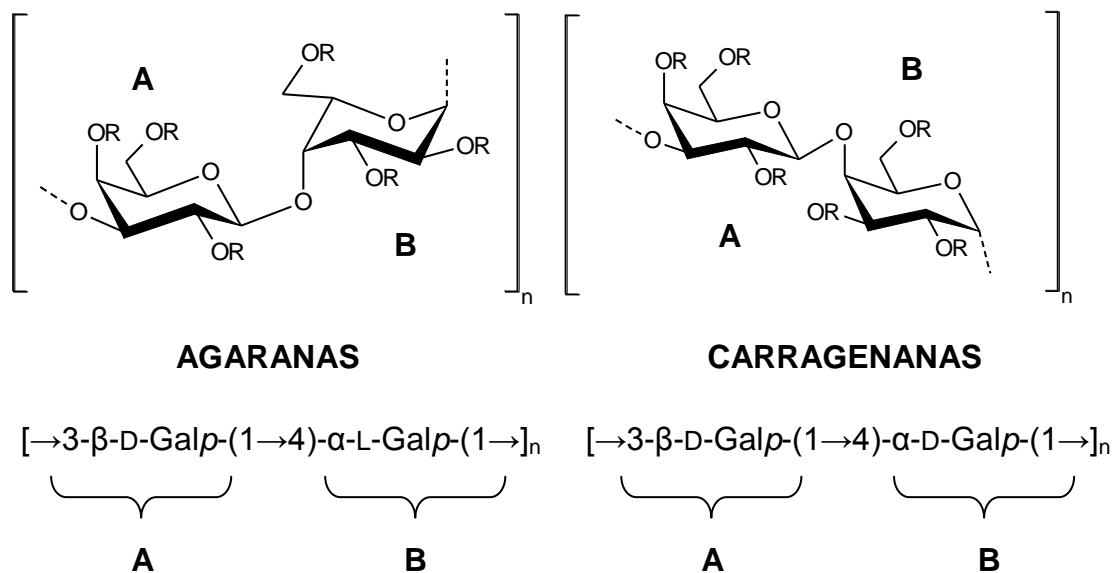
A divisão *Rhodophyta* (algas vermelhas) constitui um dos mais antigos grupos de algas eucarióticas, representadas em apenas uma classe (*Rhodophyceae*) que se divide em duas subclasses (*Bangioideae* e *Florideae*). As *Rhodophyta* abrangem cerca de 5500 espécies, espalhadas em cerca de 600 gêneros, dos quais 20 compreendem representantes de água doce e 10 contêm plantas unicelulares, sendo assim a maioria dos gêneros é composta de espécies pluricelulares marinhas (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

2.2 GALACTANAS SULFATADAS

As galactanas sulfatadas são polissacarídeos de alta massa molecular constituídos por galactose, extraídos do componente amorfo da parede celular de espécies da maioria dos gêneros da divisão *Rhodophyta*. Estruturalmente são biopolímeros dispostos em cadeias lineares formados por unidades alternadas de β -D-galactopiranoose, ligadas glicosidicamente através das posições 1 e 3 (unidades A) e de α -galactopiranoose ligadas glicosidicamente através das posições 1 e 4 (unidades B), formando uma estrutura dissacarídica repetitiva básica do tipo $(AB)_n$, conforme figura 1. As galactanas sulfatadas apresentam um variado padrão de substituição em sua unidade básica repetitiva, principalmente por grupos O-sulfato e em menor grau por grupos O-metil e acetal de ácido pirúvico, dentre outros, o que lhes confere uma ampla variabilidade estrutural (PAINTER, 1983; USOV, 1984).

A classificação das galactanas sulfatadas está baseada na estereoquímica de suas unidades 4-O-ligadas (Figura 1). Denomina-se agaranas as que possuem configuração L- e carragenanas as que possuem configuração D-. Frequentemente a unidade B de agaranas e carragenanas se apresenta na forma de 3,6-anidrogallactopiranoose (PAINTER, 1983). Além das agaranas e carragenanas, algumas ordens do filo *Rhodophyta* possuem algas que biossintetizam galactanas com estruturas intermediárias às agaranas e carragenanas. Estas galactanas são denominadas de DL-híbridas. Neste tipo de estrutura, uma mesma molécula pode apresentar a unidade B tanto na configuração D- quanto na L- (STORTZ: CEREZO, 2000).

FIGURA 1 - ESTRUTURAS DISSACARÍDICAS BÁSICAS DAS GALACTANAS EXTRAÍDAS DAS ALGAS VERMELHAS
R = H ou SO₃



2.3 CARRAGENANAS

O termo carragenana deriva do gálico “carraigeen” que significa alga ou do nome “Carraghen”, distrito irlandês onde há séculos se colhe a alga vermelha *Chondrus crispus*. Tradicionalmente a população desse distrito aquece essa alga junto com o leite para a produção caseira de um flan. Nesse processo, a gelificação do leite ocorre através da interação dos grupamentos sulfato das carragenanas presentes na alga e das cargas positivas da caseína, principal proteína do leite (PEREIRA; MESQUITA, 2004).

As carragenanas correspondem a um grupo de galactanas sulfatadas obtidas das algas vermelhas. Possuem propriedades físico-químicas como geleificante, viscosificante e emulsificante, exploradas pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (TOJO; PRADO, 2003). Os três principais tipos de carragenanas importantes sob aspecto econômico são a *kappa*, a *iota* e a *lambda*. A *kappa* (κ) e a *iota* (ι) são carragenanas formadoras de gel, enquanto a *lambda* (λ) é excelente doadora de viscosidade (USOV, 1998). O mercado para estes ficocolóides vem crescendo a uma taxa anual acima de 5%, indo de 5500 toneladas em 1970 a

índices acima de 20.000 toneladas em 1995. Em 2003 foi de aproximadamente 35.000 toneladas com valor comercializado em torno de US\$ 300 milhões. Nos últimos anos a demanda por carragenanas vem crescendo em ritmo ascendente no mercado internacional com valor comercializado estimado em US\$ 450 milhões (SAHU *et al.* 2011). Dados da produção mundial de carragenófitas de 2007, provenientes principalmente dos cultivos de *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma denticulatum* das Filipinas, Indonésia e Tanzânia, atingiram a cifra de anual de 1,6 milhões de toneladas, rendendo aproximadamente US\$ 175 milhões, segundo a FAO's (Food and Aquaculture Organization of United Nations). A produção da indústria de carragenanas excedeu 50 mil toneladas entre 2007 e 2008, com valor superior a US\$ 600 milhões, excluindo a produção da China (BOUZON *et al.*, 2009).

2.3.1.1 ESTRUTURA, CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DAS CARRAGENANAS

Estruturalmente, as carragenanas são galactanas sulfatadas de cadeia linear formadas pela díade β -(1 \rightarrow 3)-D-galactopiranosose e α (1 \rightarrow 4)-D-galactopiranosose ou α (1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactopiranosose, unidas por ligação glicosídica, constituindo assim uma unidade repetitiva, conforme figura 1 (USOV, 1984).

A classificação das carragenanas é feita em função da quantidade e da posição dos grupamentos O-sulfato na molécula, bem como da presença ou não do anel 3,6 anidro na unidade B (Tabela 1).

Rees (1963) introduziu um sistema de nomenclatura onde letras gregas são associadas às unidades repetitivas de carragenanas e estabeleceu que se tomando como base o padrão de sulfatação da unidade A das diversas carragenanas já descritas, pode-se agrupá-las em quatro famílias diferentes: *kappa*, *lambda*, *beta* e *omega* (Tabela 1). As carragenanas pertencentes à família *kappa* são aquelas nas quais a “unidade A” é 4-O-sulfatada, podendo a “unidade B” ser 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (*kappa*-carragenana); 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose-2-sulfato (*iota*-carragenana); α -D-galactopiranosose-6-sulfato (*mu*-carragenana) ou α -D-galactopiranosose-2,6-dissulfato (*nu*-carragenana), sendo as duas últimas precursoras biológicas da *kappa*- e *iota*-carragenana, respectivamente. As pertencentes à família

lambda são aquelas nas quais a “unidade A” é 2-O-sulfatada, podendo a “unidade B” ser α -D-galactopiranosose-2,6-dissulfato (*lambda*-carragenana); α -D-galactopiranosose-2-sulfato (*xi*-carragenana) ou 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose-2-sulfato (*theta*-carragenana). As carragenanas desprovidas de grupos O-sulfato em sua “unidade A” pertencem à família *beta*, podendo a “unidade B” ser 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (*beta*-carragenana); 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose-2-sulfato (*alfa*-carragenana); α -D-galactopiranosose-6-sulfato (*gamma*-carragenana) ou α -D-galactopiranosose-2,6-dissulfato (*delta*-carragenana). Finalmente, as carragenanas da família *omega* são aquelas que possuem tanto a “unidade A” quanto a “unidade B” 6-O-sulfatada (*psi*-carragenana) ou apresentam na “unidade B” o anel 3,6 anidro- α -D-galactopiranosose (*omega*-carragenana). A nomenclatura descrita acima é utilizada oficialmente em trabalhos científicos, na legislação e no comércio, porém este sistema não é adequado para descrever as estruturas de carragenanas detalhadamente. Knutsen *et al.* (1994) propuseram um sistema alternativo de nomenclatura que desde então vem sendo adotado por inúmeros autores quando necessitam descrever estruturas mais complexas de carragenanas e agaranas (Tabela 1). Nesse sistema, a unidade A, β -D-galactopiranosose, é sempre identificada pela letra “G”. A unidade B quando for α -galactopiranosose, é designada pela letra “L” ou “D”, conforme a série enantiomérica a que pertença. A 3,6-anidro-galactopiranosose é denominada de “LA”, em agaranas, e “DA” em carragenanas. A posição dos substituintes é indicada pelo número do carbono ao qual ele está ligado, seguida de “S”, quando for o grupamento O-sulfato; “M” quando for O-metil; e “P” quando for acetal de ácido pirúvico.

Esta classificação está baseada nas unidades dissacarídicas de carragenanas ditas “ideais”, pois quase sempre a estrutura real das carragenanas se apresenta de forma híbrida, contendo uma porcentagem de unidades distintas das propostas no dissacarídeo ideal (NOSEDA, 1994).

Diferentes tipos de carragenanas são extraídos de várias espécies de algas vermelhas e, dependendo da fase do seu ciclo de vida, é comum a extração de mais de um tipo de carragenana na mesma espécie. Na ordem *Gigartinales*, por exemplo, em sua fase tetraesporofítica é comum a extração da *lambda*-, enquanto que na gametofítica, da *kappa*-carragenana, apesar deste fenômeno não ser característico de todas as famílias desta ordem (NOSEDA, 1994).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM O PADRÃO DE SULFATAÇÃO DA UNIDADE A
Adaptada de Knutsen *et al.* (1994)

FAMÍLIA	3-O- β -D-Galp UNIDADE A	4-O- α -D-Galp UNIDADE B	CÓDIGO DE LETRAS ^a
KAPPA			
κ (<i>kappa</i>)	β -D-Galp-4-sulfato	3,6-anidrogalp	G4S-DA
ι (<i>iota</i>)	β -D-Galp-4-sulfato	3,6-anidrogalp-2-sulfato	G4S-DA2S
μ (<i>mu</i>)	β -D-Galp-4-sulfato	α -D-Galp-6-sulfato	G4S-D6S
ν (<i>nu</i>)	β -D-Galp-4-sulfato	α -D-Galp-2,6-dissulfato	G4S-D2S, 6S
LAMBDA			
λ (<i>lambda</i>)	β -D-Galp-2-sulfato	α -D-Galp-2,6-dissulfato	G2S-D2S, 6S
ξ (<i>xi</i>)	β -D-Galp-2-sulfato	α -D-Galp-2-sulfato	G2S-D2S
θ (<i>theta</i>)	β -D-Galp-2-sulfato	3,6-anidrogalp-2-sulfato	G2S-DA2S
BETA			
β (<i>beta</i>)	β -D-Galp	3,6-anidrogalp	G-DA
α (<i>alfa</i>)	β -D-Galp	3,6-anidrogalp-2-sulfato	G-DA2S
γ (<i>gamma</i>)	β -D-Galp	α -D-Galp-6-sulfato	G-D6S
δ (<i>delta</i>)	β -D-Galp	α -D-Galp-2,6-dissulfato	G-D2S, 6S
OMEGA			
ω (<i>omega</i>)	β -D-Galp-6-sulfato	3,6-anidrogalp	G6S-DA
ψ (<i>psi</i>)	β -D-Galp-6-sulfato	α -D-Galp-6-sulfato	G6S-D6S

^a De acordo com a definição de Knutsen *et al.* (1994)

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Os polissacarídeos naturalmente sulfatados extraídos das algas marinhas e os quimicamente sulfatados extraídos de fungos e líquens, têm sido amplamente estudados por apresentarem atividades biológicas, intrinsecamente relacionadas à estrutura do polissacarídeo, podendo ter maior ou menor intensidade de acordo com tipo de ligação glicosídica, peso molecular e grau de substituição em moléculas nativas ou sulfatadas quimicamente (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

Souza *et al.* (2007) testaram, *in vitro*, a atividade antioxidante dos polissacarídeos sulfatados de carragenanas (*kappa*, *iota* e *lambda*) e da fucoidana (polissacarídeo derivado principalmente das algas marrons e que possui alto teor de L-fucose sulfatada) extraída de *fuccus vesiculosus*. Os resultados indicaram que a *lambda*-carragenana e a fucoidana exibiram alta atividade antioxidante e antirradicais livres. Os autores encontraram uma correlação positiva entre o conteúdo de sulfato e a atividade antioxidante. Gracher *et al.* (2010) sulfataram uma manogalactana obtida do cogumelo *Pleurotus ostreatoroseus* e testaram sua atividade anticoagulante e antitrombótica, sua tendência hemorrágica e seu efeito sobre a agregação plaquetária. A atividade anticoagulante da amostra sulfatada foi determinada pelos ensaios de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) e tempo de trombina (TT). Também foram avaliados os efeitos dos polissacarídeos sobre a atividade da α -trombina e do fator Xa, na presença de antitrombina (AT) e/ou cofator II da heparina (HCII). O efeito antitrombótico foi avaliado em ratos usando um modelo de trombose venosa e a tendência hemorrágica também foi testada *in vivo*. Os resultados mostraram que a atividade anticoagulante ocorreu pela inibição da α -trombina mediada pela antitrombina e pelo cofator II da heparina. Também houve um efeito sobre a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato e α -trombina. Os autores sugerem que a manogalactana sulfatada quimicamente é uma alternativa a heparina como anticoagulante. Martinichen-Herrero *et al.* (2005), sulfataram uma β -glucana isolada do líquen *Parmotrema mantiqueirense*. Foram avaliadas a atividade anticoagulante *in vitro* através de ensaios do tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) e tempo de trombina (TT) assim como a atividade antitrombótica em modelos de ratos com trombose induzida. Os resultados mostraram que a β -glucana sulfatada (76,8%) foi efetiva como anticoagulante e antitrombótico, sendo um promissor agente antitrombótico.

2.4.1 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS GALACTANAS SULFATADAS

Estudos mostram que a atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas isoladas de algas vermelhas, como as carragenanas, está intrinsecamente relacionada à sua massa molecular e à sua composição química, especialmente na

quantidade de sulfato (NISHINO; AIZU; NAGUMO, 1991). Silva *et al.* (2010) investigaram a ação anticoagulante de três tipos de carragenanas comerciais (*kappa*, *iota* e *lambda*) através do teste de APTT e demonstraram que a alta atividade anticoagulante da *lambda*-(33,38% de sulfato) e a baixa atividade da *kappa*-carragenana (17,89% de sulfato) se deve, provavelmente, à quantidade de sulfato na molécula. Opoku *et al.* (2006) fizeram um estudo comparativo da atividade anticoagulante de uma amostra de *kappa*-carragenana nativa e de uma persulfatada, utilizando o ensaio do tempo de protrombina (PT). Os resultados mostraram que neste ensaio, a *kappa*-carragenana persulfatada mostrou efeito anticoagulante trinta vezes maior que a amostra nativa indicando que a quantidade de sulfato é importante para esse efeito. Fonseca *et al.* (2008) compararam o efeito anticoagulante e antitrombótico de duas galactanas sulfatadas obtidas das algas vermelhas *Gelidium crinale* e *Botryocladia occidentalis*. As galactanas extraídas de ambas as espécies possuem estrutura polissacarídica idêntica, com mesma massa molecular, variando apenas no padrão de sulfatação. Os resultados mostraram que a galactana sulfatada da espécie *Gelidium crinale* exibiu um efeito pró-coagulante e pró-trombótico em baixas doses (até 1 mg/kg de peso corporal), mas em doses altas (acima de 1 mg/kg de peso corporal) ela inibiu a trombose venosa e prolongou o tempo de recalcificação *ex vivo*. Por outro lado, a galactana sulfatada da espécie *Botryocladia occidentalis* demonstrou potente atividade anticoagulante e antitrombótica em baixas doses, com reversão do efeito em altas doses. Os autores concluíram que discretas diferenças na proporção e/ou distribuição dos grupamentos sulfatos na cadeia das galactanas são críticos para a interação do polímero com proteases, ativadores e inibidores do sistema de coagulação, resultando em padrões distintos de atividade anti- e pró-coagulante e de ação antitrombótica. Eles ressaltaram que estudos nessa linha de pesquisa podem contribuir na descoberta de antitrombóticos específicos, potentes e isentos de efeitos indesejáveis.

2.5 HEMOSTASIA

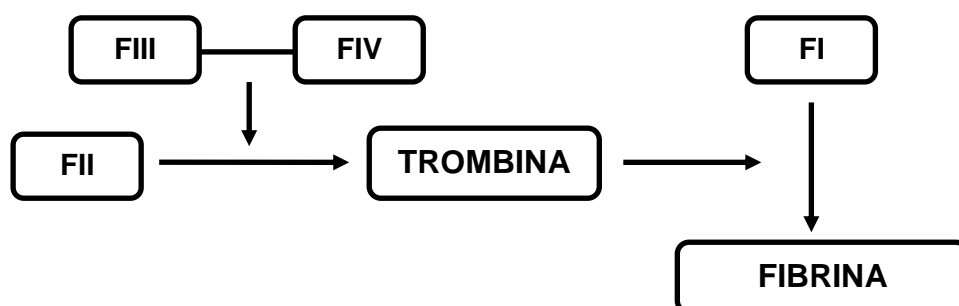
A hemostasia é um mecanismo fisiológico dos vertebrados responsável por manter a fluidez do sangue, que inclui um mecanismo de defesa o qual envolve dois

processos complementares: a formação de um coágulo ou trombo quando um vaso sofre injúria e a dissolução desse coágulo, ou fibrinólise, quando a lesão é reparada. A primeira fase da hemostasia, denominada de fase vascular, consiste na constrição de um vaso lesionado e a consequente diminuição do fluxo sanguíneo no local. Na segunda fase, pró-coagulação, ocorre a adesão e agregação plaquetária, com o objetivo de formar um tampão plaquetário e diminuir a perda sanguínea. Ao mesmo tempo ocorre uma série de reações enzimáticas em cascata, resultando na formação da fibrina, a partir da clivagem do fibrinogênio. A fibrina se agrega ao coágulo inicial conferindo-lhe estabilidade, formando uma rede insolúvel. Na terceira fase (anticoagulação) há a inibição da formação excessiva do coágulo e na quarta fase ocorre a dissolução do coágulo (fibrinólise) quando a lesão no vaso foi reparada (GENTRY, 2004; COLMAN, 2006).

2.6 COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Ao longo do século passado, à medida que novas células sanguíneas e proteínas associadas à coagulação foram sendo descobertas, diferentes modelos de mecanismos de coagulação foram propostos (ROMNEY; GLICK, 2009). Em 1905, Morawitz postulou o mecanismo clássico da coagulação (Figura 2), baseado em quatro fatores de coagulação, onde a protrombina (FII) era convertida em trombina pelo fator tissular (FIII) associado ao cálcio (FIV); e a trombina catalisava a clivagem do fibrinogênio (FI) em fibrina (ROMNEY; GLICK, 2009).

FIGURA 2 - MECANISMO CLÁSSICO DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA PROPOSTO POR MORAWITZ, 1905

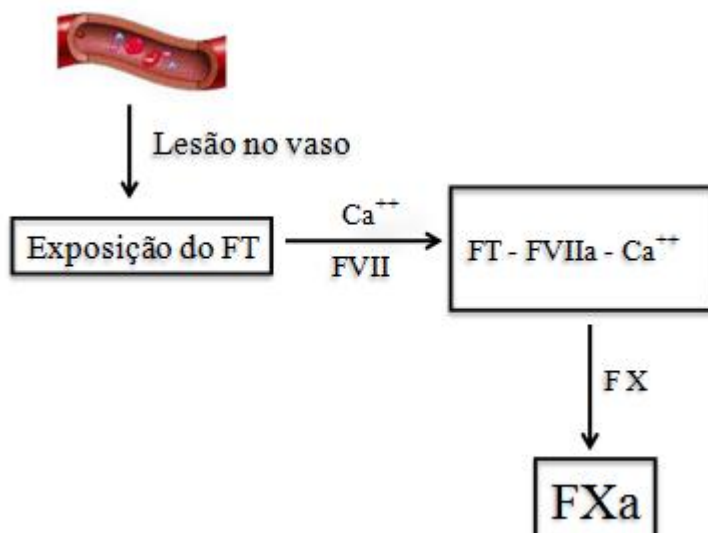


A teoria do mecanismo clássico predominou até que novos fatores de coagulação fossem sendo descobertos. Mcfarlane (1964) e Davie e Ratnoff (1964), independentemente, propusessem o modelo em cascata, que consiste em uma sequência de ativação de pró-enzimas em enzimas ativas até chegar à trombina que catalisa a clivagem do fibrinogênio em fibrina, conforme o modelo clássico. O modelo em cascata está dividido em duas vias: a extrínseca, ou via do fator tissular, e a intrínseca, ou via do contato. Ambas convergem em uma via final comum que é a ativação do fator X (FX).

2.6.1 VIA EXTRÍNSECA OU VIA DO FATOR TISSULAR

O fator tissular (FT) é uma tromboplastina tecidual expressa na camada endotelial dos vasos sanguíneos (COLMAN, 2006) que não está presente na circulação, a menos que ocorra uma lesão no vaso. Por isso a via é denominada de extrínseca (Figura 3). Uma vez exposto a corrente sanguínea, o FT se liga ao FVII que é autoclivado em FVIIa na presença de cálcio (Ca^{++}). Esse complexo (FT-FVIIa- Ca^{++}) promove a clivagem do FX em sua forma ativa FXa, iniciando o processo de coagulação pela via final comum (FRANCO, 2001; DEVLIN, 2007).

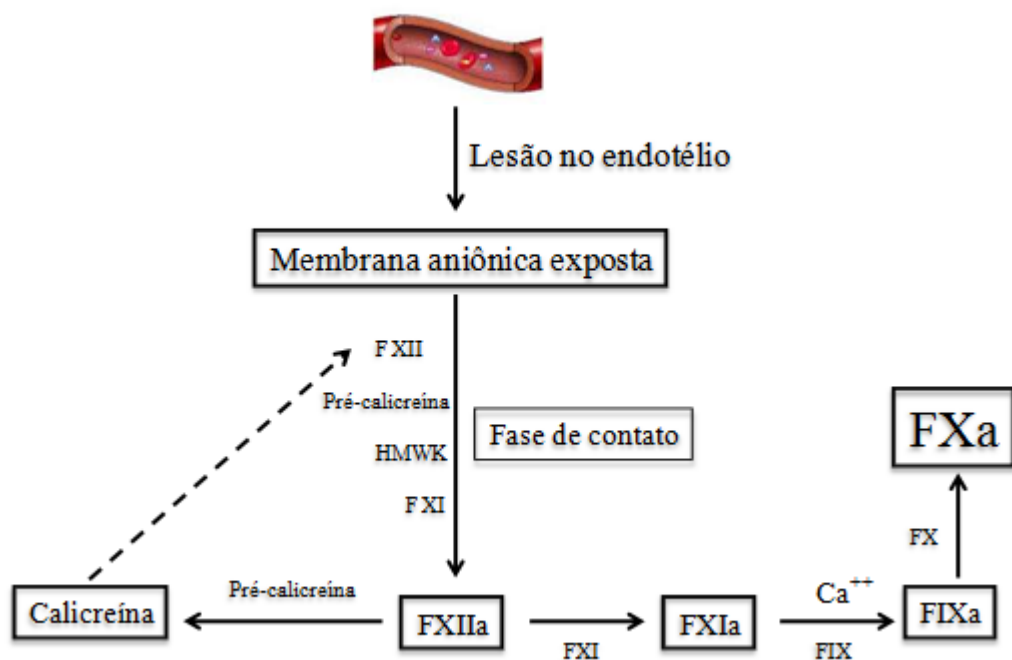
FIGURA 3 - VIA EXTRÍNSECA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA



2.6.2 VIA INTRÍNSECA OU VIA DO CONTATO

Esta via foi denominada de “intrínseca” ou “via do contato”, a partir da observação de que a coagulação sanguínea ocorre espontaneamente (*in vivo*) quando o sangue é exposto ao colágeno e este entra em contato com o FXI, FXII, a pré-caliceína e o cininogênio de alta massa molecular - HMWK (Figura 4). Essa via também é desencadeada *in vitro*, quando o sangue entra em contato com superfícies carregadas negativamente como o caulim, sílica ou vidro (LIMA *et al.*, 1992; FRANCO, 2001). Nessa fase de contato é desencadeada a cascata de coagulação, onde o colágeno ativa o fator XII. O fator XIIa, em conjunto com o HMWK, converte a pré-caliceína em caliceína e esta, por retroalimentação, converte mais FXII em FXIIa. O fator XIIa ativa o fator XI. Na presença de cálcio (Ca^{++}) o fator XIa ativa o fator IX. O fator IXa, juntamente com o fator VIIIa, Ca^{++} e fosfolípidios formam o complexo tenase que ativa o fator X (NORRIS, 2003).

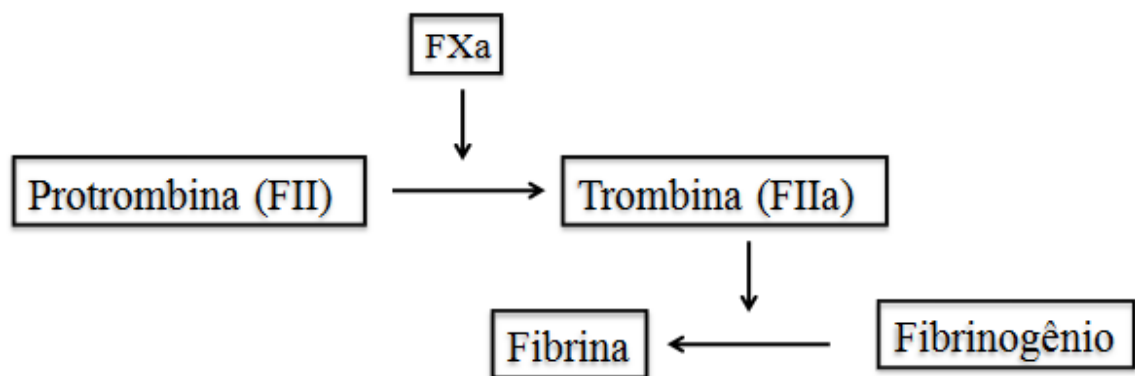
FIGURA 4 - VIA INTRÍNSECA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA



2.6.3 VIA FINAL COMUM

Nesta via a protrombina (FII) é convertida em trombina pela ação do fator Xa. A trombina cliva o fibrinogênio em fibrina, formando o coágulo (Figura 5).

FIGURA 5 - VIA FINAL COMUM DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA



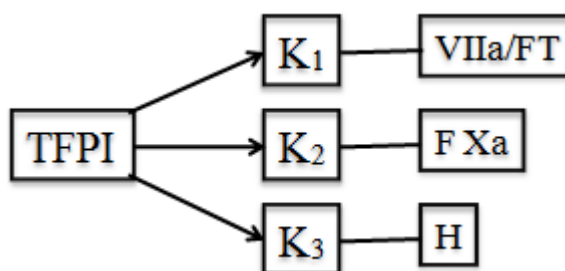
2.7 REGULAÇÃO DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

O mecanismo de coagulação sanguínea deve ser estritamente regulado no sentido de evitar a formação de fibrina em excesso e consequentemente a oclusão vascular (NORRIS, 2003). A regulação ocorre através da inibição enzimática ou por modulação da atividade dos cofatores, diretamente no local da lesão vascular e em cada etapa da cascata (DAHLBÄCK, 2000). O sistema de anticoagulação atua desde o início da coagulação através de inibidores fisiológicos, destacando os mais relevantes biologicamente como o inibidor da via do fator tissular (TFPI – *tissue factor pathway inhibitor*), a antitrombina (AT), a proteína C (PC) e o cofator II da heparina (HCII).

2.7.1 INIBIDOR DA VIA DO FATOR TISSULAR (TFPI)

O TFPI é uma glicoproteína expressa nas células endoteliais que possui três domínios inibitórios do tipo “Kunitz”, denominados de K1, K2 e K3 (WUN *et al.*, 1988; FRANCO, 2001). O domínio K1 tem afinidade pelo complexo FVIIa/TF, o domínio K2 pelo fator Xa e o K3 pela heparina ou outro glicosaminoglicano (MINE *et al.*, 2002). O TFPI atua desde o início da coagulação, principalmente através do bloqueio do complexo FVIIa/TF (DEVLIN, 2007), quando este se liga ao domínio K1 (Figura 6).

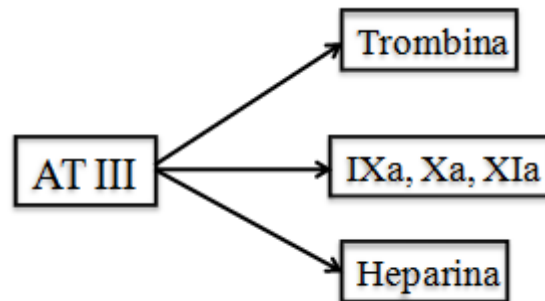
FIGURA 6 - DOMÍNIOS INIBITÓRIOS DO TFPI (K1, K2 e K3) E SUAS MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO



2.7.2 ANTITROMBINA (AT)

A antitrombina é uma serpina inibidora de serino-proteases, considerada a principal enzima inibitória do sistema de coagulação, atuando como inibidor primário da trombina, além de outras enzimas do sistema de coagulação como os fatores IXa, Xa e XIa. Como efeito adicional, a AT acelera a dissociação do complexo FVIIa/TF, eliminando a atividade pró-coagulante excessiva (Figura 7). O heparan sulfato, uma glicoproteína presente na membrana das células endoteliais, acelera as reações catalisadas pela antitrombina. A heparina, estruturalmente similar ao heparan, potencializa ainda mais essa reação (FRANCO, 2001).

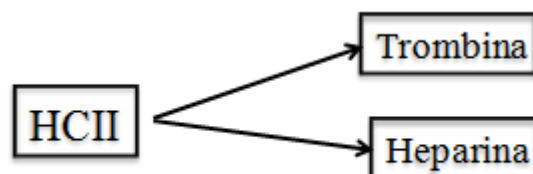
FIGURA 7 - ANTITROMBINA E SEUS LIGANTES



2.7.3 COFATOR II DA HEPARINA (HCII)

O cofator II da heparina (HCII) é uma glicoproteína homóloga a antitrombina que tem ação inibitória somente sobre a trombina, porém em baixa atividade quando comparado a antitrombina (Figura 8). É ativado pelo dermatan sulfato e pela heparina, sendo que a quantidade de heparina necessária para a sua ativação é bem maior do que necessita a antitrombina (TOLLEFSEN, 2007).

FIGURA 8 - COFATOR II DA HEPARINA (HCII) E SEUS LIGANTES



2.8 HEPARINAS

A heparina foi o primeiro anticoagulante descrito (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010). Mesmo tendo sido descoberta no início do século passado, quando foi isolada de fígado de cães, o seu uso clínico na prevenção da trombose venosa só foi iniciado na década de 1940 devido a dificuldades na purificação e padronização terapêutica (MUELLER, 2004). O seu mecanismo de ação foi elucidado em 1973 (MIDDELDORP, 2008), sendo atualmente o agente anticoagulante e antitrombótico mais utilizado no mundo para o tratamento da trombose venosa, síndromes coronarianas, coagulação intravascular disseminada, além de procedimentos como a hemodiálise, circulação extracorpórea e coleta de sangue. Sua administração só pode ser feita através das vias endovenosa e subcutânea, por não ser absorvida pelo trato gastrointestinal (MERLI, 2005).

Existem duas formas de heparina disponíveis, a não-fracionada (UFH – *unfractionated heparin*) e a de baixa massa molecular (LMWH - *low-molecular-weight heparin*).

Estruturalmente a UFH consiste em uma mistura de glucosaminoglicanas altamente sulfatadas, com massa molecular variando em torno de 3000 a 30000 Da (MIDDELDORP, 2007; DINWOODEY; ANSELL, 2006).

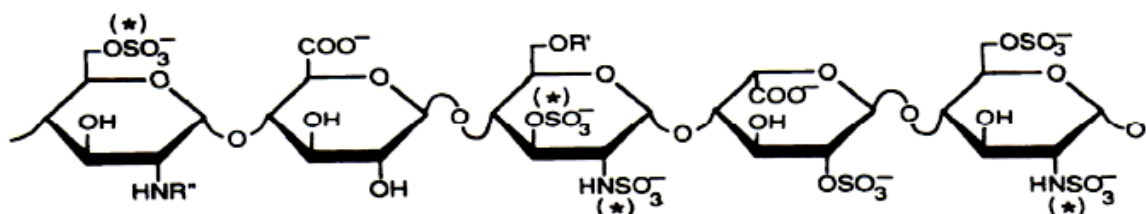
A cadeia polissacarídica da UFH é constituída por uma sequência alternada de α -D-glucosamina e ácido urônico através de ligações α (1 \rightarrow 4). A maioria das unidades de glucosamina são desacetiladas no nitrogênio e sulfatadas nos grupos amino e hidroxil (N-SO₃ e 6-OSO₃). Grupamentos sulfato também podem ser encontrados na posição C3. As unidades de ácido urônico são o α -L-idurônico e o β -D-glucurônico, epímeros em C5 (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

O mecanismo de ação da UFH consiste na ligação e ativação da antitrombina, a qual se liga e neutraliza os fatores de coagulação serina proteases trombina e FXa (HIRSH, 1991).

Esta ação é atribuída a uma região pentassacarídica específica (Figura 9), distribuída aleatoriamente na cadeia, constituindo um domínio de ligação para a antitrombina (LAM; SILBERT; ROSENBERG, 1976; LINDAHL *et al.* 1984).

FIGURA 9 - SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA

R'(-H OU SO_3) e R''(- SO_3 OU - COCH_3). Os grupos sulfato marcados com asterisco são considerados essenciais para a ligação com a antitrombina
 FONTE: Lindahl *et al.* (1984)



Somente 30% da cadeia da UFH contêm essa sequência pentassacarídica, sendo o restante da cadeia inativa, mas capaz de se ligar não especificamente a outras proteínas plasmáticas, a células endoteliais e ao fator plaquetário 4, o que torna a farmacocinética da UFH imprevisível, necessitando que o seu uso seja monitorado (RICH, 2004).

O uso da UFH em larga escala evidenciou uma série de reações adversas, como indução a osteoporose, trombocitopenia, aumento da atividade plaquetária e complicações hemorrágicas, além do risco de contaminação por patógenos animais, uma vez que são extraídas da mucosa intestinal de suínos e pulmão de bovinos (MESTECKINA; SHCHERBUKHIN, 2010). Outra grande desvantagem é que devido a sua heterogeneidade estrutural, cada lote produzido apresenta diferença no teor da fração ativa, o que pode levar ao risco de sub ou super dosagens, caso o uso não seja monitorado (MERLI, 2005).

As heparinas de baixa massa molecular (LMWH) surgiram com o objetivo de melhorar o perfil farmacocinético e farmacológico da UFH (COHEN, 2000). Elas possuem cerca de um terço do peso molecular da UFH e são obtidas através de vários processos de despolimerização. Possuem a sequência específica para a ligação com a antitrombina, inibindo o FXa, mas por terem menor tamanho, são menos capazes de inibir a trombina (DINWOODEY; ANSELL, 2006).

As LMWH apresentam inúmeras vantagens frente à UFH, como melhor biodisponibilidade e maior tempo de meia vida, diminuindo o número de administrações diárias, além de não necessitarem de monitoramento laboratorial. Os

efeitos adversos também são menores, mas estes polímeros ainda apresentam algumas limitações como à heterogeneidade estrutural (CAUGHEY, 2003).

2.9 SULFATAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS

A sulfatação é a principal estratégia de modificação química de polissacarídeos. É realizada em polímeros previamente caracterizados, que apresentam alguma propriedade físico-química a ser melhorada ou potencial biológico a ser explorado. A sulfatação acontece através de reação de substituição nucleofílica em grupos hidroxila formando ésteres de sulfato. Não há na literatura uma metodologia universal para a síntese de polissacarídeos sulfatados em função da diversidade estrutural apresentada pelos mesmos (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010). A configuração de ligações glicosídicas, a massa molecular, a disposição dos grupos substituintes na molécula e o grau de substituição são fatores ligados a natureza química de cada polissacarídeo que influenciam diretamente no grau de sulfatação da molécula. Alguns parâmetros, ligados ao ambiente reacional, também influenciam na eficiência da sulfatação, como o agente sulfatante utilizado, o solvente, a proporção molar dos componentes da reação, o tempo de reação e a temperatura.

2.9.1 PRINCIPAIS AGENTES SULFATANTES

A escolha do agente sulfatante é um dos parâmetros mais importantes na eficiência de uma reação de sulfatação. Há relatos de que no início do século XX as reações de sulfatação eram realizadas utilizando-se o ácido sulfúrico (GILBERT, 1965). Estruturas como o polietilenoglicol, o glicerol e os polissacarídeos podem ser sulfatados dessa maneira, mas com numerosas desvantagens que vão desde baixo rendimento à degradação do polímero (AL-HORANI; DESAI, 2010).

O ácido cloro-sulfônico vem sendo utilizado há décadas como agente sulfatante de polissacarídeos. Porém, em virtude de sua natureza ácida, alguns

efeitos indesejáveis como a clivagem de grupos funcionais e a degradação da cadeia principal podem ocorrer durante a reação. Para parcialmente neutralizar esses efeitos, a piridina tem sido empregada como solvente nessas condições de reação. Contudo, ainda há relatos de degradação do polímero, bem como da dificuldade em eliminar a piridina do meio reacional por formação de ligação covalente desta com os terminais redutores dos polissacarídeos (PAPY-GARCIA *et al.* 2005). Contudo, Liu *et al.* (2009) sulfataram uma amostra extraída do fungo *Phellinus ribis* com ácido cloro-sulfônico e constatou que houve pouca degradação no processo de sulfatação, comprovado através da determinação da massa molecular das amostras sulfatadas. Nesse caso, os autores atribuíram à escolha do solvente formamida e o uso de temperatura branda como sendo os responsáveis pela manutenção da integridade do polissacarídeo. Yang *et al.* (2002) corroboraram com essa conclusão mostrando que o aumento da temperatura de reação, assim como a utilização de um solvente inadequado são os fatores que mais contribuem para a degradação de polissacarídeos durante a sulfatação.

Atualmente, os agentes sulfatantes mais utilizados são os complexos de trióxido de enxofre com aminas (piridina, trietilamina e trimetilamina) e amidas (dimetil formamida). Estudos apontam algumas vantagens na utilização desses complexos, como a facilidade na aquisição ou no preparo em laboratório, sua natureza sólida em temperatura ambiente e sua estabilidade em altas temperaturas, sendo os mais adequados na sulfatação de grupos alcoólicos presentes em carboidratos (AL-HORANI; DESAI, 2010). Mas há relatos de que eles promovem a despolimerização, pois normalmente apresentam caráter ácido quando dissolvidos em solventes orgânicos. Zhang *et al.* (2010) testaram a atividade antioxidante da porfirana (agarana do gênero *Porphyra*) extraída da espécie *Porphyra haitanensis* e de seus derivados sulfatados utilizando o complexo de trióxido de enxofre – dimetil formamida. Nesse experimento, após a sulfatação, houve diminuição na massa molecular das amostras em decorrência da clivagem das ligações glicosídicas do polímero, causando a diminuição no tamanho da molécula. Eles observaram que a atividade antioxidante diminuiu mesmo em uma amostra com alto grau de sulfatação, concluindo que a massa molecular do polissacarídeo é um fator importante na relação estrutura e atividade biológica. No mesmo experimento, os autores relataram que quando foram utilizadas amostras acetiladas a atividade aumentou, mesmo com a degradação do polímero. Em um estudo de atividade

antitumoral utilizando a *lambda*-carragenana com diferentes massas moleculares, ZHOU *et al.* (2006) relataram diferentes efeitos, sendo o melhor alcançado com amostras de menor massa molecular.

2.9.2 SULFATAÇÃO REGIOSSELETIVA DE POLISSACARÍDEOS

A sulfatação regiosseletiva de polissacarídeos é uma ferramenta importante utilizada quando se quer direcionar a entrada do éster de sulfato em uma posição específica da estrutura com múltiplas hidroxilas livres. Algumas estratégias têm sido utilizadas para conduzir a regiosseletividade em reações de sulfatação (AL-HORANI; DESAI, 2010), sendo a principal delas a proteção da hidroxila a qual não se deseja sulfatar, com a introdução de um grupo protetor. Essa estratégia é feita em uma etapa intermediária que precede a adição do agente sulfatante, sendo este removido através de uma reação de desproteção, depois de concluída a reação de sulfatação. A etapa intermediária é feita através de uma reação de acilação seletiva que é amplamente utilizada na síntese de carboidratos. A mais comum delas é a benzoilação, realizada comumente na presença de cloreto de benzoíla. Também é comum a ativação utilizando o complexo tributilestanil-2-oxazolidona $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2\text{O}$, seguido de um ataque eletrofílico com cloreto de benzoíla. Porém, a seletividade através de benzoilação não é tão alta (JIANG; CHAN, 1998). Outra estratégia de proteção é a acetilação seletiva utilizando o cloridrato de pivaloíla (trimetil acetil cloridrato). Esta técnica tem sido bastante utilizada como método seletivo para a esterificação de hidroxilas primárias na presença de grupos hidroxil secundários. Petit *et al.* (2004), sulfataram seletivamente as hidroxilas secundárias de uma glucana bacteriana utilizando o cloridrato de pivaloíla como grupo protetor da hidroxila primária. Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da amostra sulfatada mostraram um sinal na região do carbono 6 previamente detectado antes da reação de proteção, indicando que a introdução do grupo pivaloíla não foi completa. Em outro estudo, Gao *et al.*, (1997), sulfataram seletivamente as hidroxilas ligadas aos carbonos secundários da estrutura da curdulana, exopolissacarídeo microbiano formado por unidades de glucose β (1 \rightarrow 3) ligadas, através da proteção das hidroxilas primárias com pivaloíla e posterior sulfatação. A estrutura do 6-piv-curdulana foi

confirmada por ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C) através do deslocamento total do sinal referente ao C6, da região de 63,0 para 65,0 ppm, indicando 100% de esterificação nessa posição.

Zhang *et al.* (2010) realizaram duas reações de sulfatação regiosseletivas na porfirana obtida da alga vermelha *Porphyra haitanensis*. A amostra 1 foi sulfatada seletivamente na hidroxila ligada ao carbono primário. A amostra 2 foi sulfatada nas hidroxilas ligadas aos carbonos secundários da posição 2 do dímero, utilizando o grupo protetor dimetóxi tritil cloridrato na hidroxila primária. Os resultados mostraram que a sulfatação da amostra 1 aconteceu com maior facilidade e com maior grau de substituição do que na amostra 2, mostrando que a hidroxila ligada ao carbono primário é estericamente menos blindada, alcançando maior reatividade.

Os estudos citados mostram o grau de dificuldade na condução de reações de sulfatação regiosseletivas, principalmente na etapa intermediária de proteção através da reação de acilação, onde o rendimento depende da escolha correta do agente protetor, do solvente, da concentração do grupo protetor, do catalisador e das condições gerais da reação, como o tempo e a temperatura.

3 JUSTIFICATIVA

As algas vermelhas são a principal fonte não-animal de polissacarídeos sulfatados encontrada na natureza. Seus principais produtos de extração são as galactanas sulfatadas (carragenanas e agaranas) que são largamente exploradas comercialmente pelas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, em virtude de suas propriedades geleificantes e viscosificantes, assim como são exploradas por pesquisadores da área médica devido ao seu potencial farmacológico. Esses polímeros aniônicos são extraídos em meio aquoso, através de metodologias simples, sem agressão ao meio ambiente e a um baixo custo, além de serem isentos de patógenos animais. O tipo de atividade biológica e as propriedades físico-químicas atribuídas as galactanas sulfatadas estão intrinsecamente relacionadas às suas características estruturais. Vários estudos, alguns citados nesse trabalho, demonstram que variações no peso molecular, no tipo de ligação glicosídica e no posicionamento dos grupamentos sulfato contribuem para a melhoria da atividade biológica desses biopolímeros. Em relação às propriedades biológicas atribuídas as carragenanas, estudos mostram que a atividade anticoagulante está intrinsecamente relacionada à presença de grupamentos sulfatos na estrutura desses polissacarídeos e que essa atividade é variável quanto ao número e a posição desses substituintes na estrutura. Assim, o foco principal desse trabalho está em promover modificações químicas na estrutura de três carragenanas nativas (*kappa*, *iota* e *lambda*) através de sulfatações regiosseletivas e persulfatação para estudo comparativo da relação estrutura/atividade anticoagulante dos novos padrões de sulfatação obtidos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Modificar quimicamente a estrutura das carragenanas *kappa*, *iota* e *theta*, através de sulfatações seletivas e persulfatação para a realização de um estudo comparativo de atividade anticoagulante.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e purificar as carragenanas das algas vermelhas *Kapaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum* e *Gigartina skottsbergii*;
- Realizar tratamento alcalino nas frações extraídas das algas *Eucheuma denticulatum* e *Gigartina skottsbergii* para a obtenção da *iota*- e *theta*-carragenana, respectivamente;
- Determinar a estrutura química das carragenanas extraídas e modificadas através de métodos químicos e espectroscópicos;
- Sulfatar seletivamente a *kappa*-carragenana para obter uma fração com a díade G4S,6S-DA;
- Esterificar a *kappa*-carragenana para a obtenção de uma fração contendo o intermediário G4S,6piv-DA;
- Sulfatar a fração contendo o intermediário G4S,6piv-DA e realizar a deacilação com álcali para obter uma fração contendo a díade G2S,4S-DA2S;
- Dessulfatar a *kappa*-carragenana para a obtenção de uma fração contendo a díade G-DA (beta-carragenana);
- Sulfatar seletivamente a fração dessulfatada (beta-carragenana) para obter uma fração com a díade G6S-DA;
- Persulfatar a *kappa*-carragenana para obter uma fração com a díade G2S,4S,6S-DA2S;

- Sulfatar seletivamente a *iota*-carragenana para obter uma fração com a díade G4S,6S-DA2S;
- Sulfatar seletivamente a *theta*-carragenana para obter uma fração com a díade G2S,6S-DA2S;
- Comparar a atividade anticoagulante *in vitro* de todas as frações obtidas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ALGAS PRODUTORAS DE CARRAGENANAS: OBTENÇÃO E EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram extraídas três carragenanas naturalmente sulfatadas - *kappa*, *iota* e *lambda*, das algas *Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum* e *Gigartina skottsbergii*, respectivamente.

5.1.1 *Kappaphycus alvarezii*

A espécie *Kappaphycus alvarezii* foi obtida do cultivo desenvolvido no Núcleo de Pesquisa do Litoral Norte, em Ubatuba, São Paulo (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999). A alga foi lavada com água corrente e seca à temperatura de 60°C até peso constante e submetida a tratamento alcalino com KOH 6% por 48h em temperatura ambiente. Em seguida foi lavada com água corrente e seca a 60°C até peso constante.

A alga seca (40 g) foi processada em um moinho de facas e submetida à extração dos polissacarídeos em 2 L de solução tampão fosfato 0,025 M (pH 7,0), sob agitação mecânica, a 65°C, por 5 h. Após centrifugação (8000 RPM, 20°C, por 20 minutos), o sobrenadante (1,5 L) foi tratado com 4,5 L de etanol (3 volumes). Os polissacarídeos precipitaram na forma de longas fibras e foram separados da solução etanólica com o auxílio de um bastão de vidro, redissolvidos em água destilada, dialisados (membrana de 12-14 KDa) contra cloreto de sódio (NaCl) e em seguida com água destilada até a remoção do sal. Após diálise os polissacarídeos foram liofilizados, gerando uma fração denominada de K, com rendimento de 23 g.

A fração K (10 g) foi solubilizada em 4 L de água destilada e tratada com 29,8 g de KCl (0,1 M), sob agitação mecânica, por 3h, seguida de repouso por 16h, a 4°C (CEREZO, 1967). Após centrifugação (8.000 RPM, 20°C, por 20 minutos), foi adicionado ao sobrenadante, 115,6 g de KCl (0,5 M), sob agitação mecânica, por 3h,

seguida de repouso por 16h, a 4°C. Após centrifugação (8.000 RPM, 20°C, por 20 minutos), foi adicionado ao sobrenadante, 346,7 g de KCl (2,0 M), sob agitação mecânica, por 3h, seguida de repouso por 16h, a 4°C. Depois, os precipitados foram submetidos à diálise fechada em membrana de 12-14 KDa contra uma solução de NaCl 1 M por 24h e em seguida com água destilada por 4 dias (trocada a cada 24h) até a completa remoção do sal. Após diálise, os precipitados foram liofilizados, gerando as frações K-01 (*kappa*-carragenana), K-05 e K-2, com rendimento de 7,02, 2,4 e 1,5 g, respectivamente.

5.1.2 *Eucheuma denticulatum*

Amostras comerciais de *Eucheuma denticulatum*, importada das Filipinas pela indústria Gelymar S.A. (Puerto Montt, Chile), foram gentilmente cedidas ao Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR.

A alga seca e moída (5 g) foi submetida à extração com 0,5 L de água destilada, sob agitação mecânica, a 80°C, por 4h. Após centrifugação (8000 RPM, a 20°C, por 20 minutos), o sobrenadante foi tratado com etanol (3 volumes). O precipitado (fibras de polissacarídeos) foi recolhido com o auxílio de um bastão de vidro, redissolvido em água destilada e dialisado em membrana de 12-14 KDa contra NaCl 1 M por 24h e em seguida com água destilada até a remoção do sal. Depois a amostra foi liofilizada, gerando a fração E, com rendimento de 2,8 g.

A fração E foi submetida a tratamento alcalino segundo a metodologia de Ciancia *et al.* (1993). Uma amostra (2,0 g) foi solubilizada em 1,0 L de água destilada e tratada com 0,2 g de boroidreto de sódio (NaBH₄) por 16 h. Adicionou-se 0,5 L de uma solução de hidróxido de sódio 3 M (concentração final de 1 M), e novamente 0,1 g de NaBH₄. A solução foi aquecida a 80°C por 30 minutos, sendo em seguida neutralizada com ácido clorídrico fumegante, em banho de gelo. Depois a solução foi concentrada em rota-evaporador, dialisada (membrana de 12-14 KDa) contra NaCl 1 M por 24h e em seguida com água destilada até a remoção do sal. Após diálise a amostra foi liofilizada, gerando a fração IC (*iota*-carragenana) com rendimento de 1,71 g em relação ao peso seco da alga.

5.1.3 *Gigartina skottsbergii*

A alga *Gigartina skottsbergii* é proveniente da Bahia de Camarones, Província de Chubut, Argentina (GONÇALVES *et al.*, 2005). A alga seca e moída (15 g) foi submetida à extração com 1,0 L de água destilada, sob agitação mecânica, a 70°C, por 4h. Após centrifugação (8000 RPM, a 20°C, por 20 minutos), o sobrenadante foi tratado com etanol (3 volumes). O precipitado (fibras de polissacarídeos) foi recolhido com um bastão de vidro, redissolvido em água destilada, dialisado (membrana de 12-14 KDa) contra NaCl 1 M por 24h e em seguida com água destilada até a remoção do sal. Após diálise a amostra foi liofilizada, gerando uma fração denominada de G, com rendimento de 7,95 g em relação ao peso seco da alga.

A fração G (7,95 g) foi solubilizada em 3,2 L de água destilada e tratada com 190,8 g de KCl, obtendo a concentração 0,8 M (NOSEDA, 1994). A solução foi mantida sob agitação mecânica por 4h e em repouso por 16h a 4°C. Após centrifugação (8.000 RPM, 20°C, 20 minutos) o precipitado foi dialisado em membrana de 12-14 KDa contra cloreto de sódio 1 M e água destilada. Após diálise a amostra foi liofilizada, gerando a fração G-08 (*lambda*-carragenana), com rendimento de 6,6 g em relação ao peso seco da alga.

A fração G-08 (3,0 g) foi solubilizada em 2,25 L de água destilada e tratada com 0,3 g de NaBH₄ (10% em relação à massa de carboidrato) por 16 h. Adicionou-se então 0,75 L de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 3 M (concentração final de 1 M), e 0,15 g de NaBH₄ (5% em relação a massa de carboidrato). A solução foi aquecida a 80° C por 28h (DOYLE *et al.*, 2010). Depois a solução foi concentrada em rota-evaporador, dialisada (membrana de 12-14 KDa) contra NaCl 1 M e água destilada. Após diálise a amostra foi liofilizada, gerando a fração TC (*theta*-carragenana), com rendimento de 1,3 g em relação ao peso seco da alga.

5.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM *KAPPA*-CARRAGENANA (K-01)

5.2.1 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-016S ATRAVÉS DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE K-01

A fração K-01 (2 g) foi dissolvida em 160 mL de água destilada e à solução foram adicionados 300 mg de NaBH_4 para redução dos terminais redutores dos polímeros (pH 9,0). Deixou-se sob agitação magnética até o dia seguinte. Após esse período o pH da solução foi corrigido para 4,0 com a adição de algumas gotas de ácido acético glacial. Depois, a amostra reduzida foi submetida à diálise (membrana de 12-14 KDa) contra NaCl 1 M e água destilada. Após a diálise a amostra foi liofilizada. Uma amostra da fração K-01 reduzida (200 mg) foi solubilizada em 40 mL de dimetilformamida anidra (DMFa). Adicionou-se, sob agitação, 2 g do complexo de trióxido de enxofre-piridina ($\text{SO}_3\text{-Py}$), juntamente com 4 mL de 2-metil-2-butenol (2M2B) e deixou-se reagindo por 1h. O pH da reação baixou para 2,0 no momento da adição do complexo, sendo corrigido para 7,0 após a adição de 0,3 mL de trietilamina. A reação foi interrompida com banho de gelo e neutralizada com 10 mL de bicarbonato de sódio 1,0 M. O polissacarídeo foi recuperado do meio reacional através da adição de etanol (3 volumes). Após centrifugação, o precipitado foi redissolvido em tampão fosfato (para manter o pH em 7,0), dialisado (membrana de 12-12 KDa) contra NaCl 1 M e liofilizado, gerando a fração K-016S, com rendimento de 215 mg.

5.2.2 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01OS ATRAVÉS DA PERSULFATAÇÃO DE K-01

A fração K-01 foi tratada com cloridrato de trietilamina para deixá-la na forma de sal de trietilamônio com o objetivo de melhorar a solubilidade do polissacarídeo em DMSO. Para a formação do sal procedeu-se do seguinte modo: uma amostra de 5 g da resina catiônica (DOWEX 50x8) na forma de H^+ foi lavada com água destilada até pH 5,5. Em seguida a resina lavada e seca foi incorporada a 40 mL de uma

solução de cloridrato de trietilamina a 5%, sob agitação, por 16h, quando foi novamente lavada com água destilada até pH 5,5. Uma amostra de 500 mg da fração K-01 (reduzida) foi solubilizada em 40 mL de água destilada, sendo a solução incorporada, sob agitação, à resina previamente tratada com cloridrato de trietilamina (pH = 4,5). Após 16h, a solução com a resina foi filtrada em papel de filtro e lavada com água destilada até reação negativa ao fenol sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). O filtrado foi dialisado em membrana de 12-14 KDa contra água destilada e em seguida liofilizado, gerando a fração K-01T, com rendimento de 520 mg. Uma amostra (200 mg) da fração K-01T foi solubilizada em 20 mL de DMF anidra. Adicionou-se, lentamente e sob agitação magnética, 2 g de SO₃-Py, juntamente com 4 mL de 2M2B e deixou-se reagindo por 7h. O pH do meio reacional manteve-se em 4,5. A reação foi interrompida com banho de gelo e neutralizada com 10 mL de bicarbonato de sódio 1,0 M. O polissacarídeo foi recuperado do meio reacional através da adição de etanol (3 volumes). Após centrifugação, o precipitado foi redissolvido em 10 mL de tampão fosfato, dialisado (em membrana de 12-14 KDa contra cloreto de sódio por 24h e em seguida com água destilada) e liofilizado, gerando a fração K-01OS, com rendimento de 295 mg.

5.2.3 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01ES ATRAVÉS DA ESTERIFICAÇÃO E SULFATAÇÃO SELETIVA DE K-01

A fração K-01 previamente reduzida (200 mg) foi solubilizada em 40 mL de DMFa, juntamente com 0,4 g de lauril sulfato de sódio (SDS). Em seguida adicionou-se 2,9 mL de cloridrato de pivaloíla e 0,17 g de 4-dimetilamino piridina (4-DMAP) como catalisador. O pH do meio reacional (3,0) foi corrigido para 7,0 com a adição 6,4 mL de piridina. Adicionou-se, em intervalos de 10 minutos e por mais duas vezes, 2,9 mL de pivaloyl cloridrato. Deixou-se reagir por 17h, sob agitação, a 20°C. A reação foi interrompida com banho de gelo e o polissacarídeo foi recuperado do meio reacional através da adição de etanol (3 volumes). Após centrifugação, o precipitado foi redissolvido em tampão fosfato, dialisado e liofilizado, gerando a fração K-01E, com rendimento de 205 mg. Uma amostra da fração K-01E (100 mg) foi solubilizada em 20 mL de DMFa. Em seguida adicionou-se 1,46 g de SO₃-Py,

sob agitação magnética a 35°C, juntamente com 2 mL de 2M2B. O pH do meio foi corrigido para 7,0 com 0,3 mL de trietilamina. Após 17h a reação foi interrompida com banho de gelo e o polissacarídeo foi recuperado do meio reacional através da adição de etanol (3 volumes). Após centrifugação, o precipitado foi redissolvido em tampão fosfato, dialisado e liofilizado. Em seguida a fração K-016E foi solubilizada em 20 mL de uma solução de NaOH 1 M (pH 12), sob agitação, por 4h, para a remoção dos grupos pivaloíla. A solução foi neutralizada com algumas gotas de ácido clorídrico, sendo em seguida dialisada em membrana de 12-14 kDa contra água destilada e depois liofilizada, gerando a fração K-01ES, com rendimento de 95 mg.

5.2.4 DESSULFATAÇÃO DE K-01 PARA FORMAÇÃO DA FRAÇÃO KD E OBTENÇÃO DA FRAÇÃO KD-6S ATRAVÉS DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE KD

Inicialmente, a fração K-01 foi submetida a um processo de dessulfatação por tratamento solvolítico (NAGASAWA; INOUE; KAMATA, 1977). Uma amostra de K-01 (200 mg) foi solubilizada em 40 mL de água destilada, seguida da adição de 2 g de resina catiônica DOWEX 50 x 8 na forma H⁺ (1 mg de polissacarídeo/10 mg de resina), sob agitação magnética, a 20°C, durante 45 minutos (pH entre 1-2). A solução foi filtrada e o sobrenadante neutralizado com piridina até pH 7,0 e liofilizado. O polissacarídeo, na forma de sal de piridônio (200 mg), foi solubilizado em 60 mL da mistura reativa (DMSO, metanol e piridina na proporção de 89:10:1) e foi mantido a 100°C por 4h, em estufa previamente estabilizada. Após resfriamento, a amostra dessulfatada foi dialisada em água corrente por 24h e em seguida em diálise fechada por mais três dias em água destilada. O dialisado foi liofilizado, gerando a fração KD, com rendimento de 114 mg. Uma alíquota (30 mg) da fração KD foi solubilizada em 6 mL de DMFa. Em seguida adicionou-se 300 mg de SO₃-Py e 0,6 mL de 2M2B, sob agitação, a 20°C. Após 1h a reação foi interrompida com banho de gelo e o polissacarídeo foi precipitado com etanol (3 volumes). Após centrifugação, o precipitado foi redissolvido em tampão fosfato, dialisado (membrana de 12-14 KDa) contra cloreto de sódio 1 M de água destilada. Após diálise a amostra foi liofilizada, gerando a fração KD-6S, com rendimento de 26 mg.

5.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM *IOTA*-CARRAGENANA (IC)

5.3.1 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO IC-6S ATRAVÉS DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE IC

A fração IC (50 mg) foi solubilizada em 10 mL de DMFa. Adicionou-se 730 mg de SO₃-Py, sob agitação, a 35°C, juntamente com 1,5 mL de 2M2B. O pH do meio (5,0) foi corrigido para 7,0 com 0,15 mL de trietilamina. Após 1h a reação foi interrompida com banho de gelo e o polissacarídeo foi precipitado com etanol (3 volumes). Após centrifugação, o precipitado foi redissolvido em 10 mL de tampão fosfato 0,025 M, dialisado (membrana de 12-14 KDa) contra NaCl 1 M e água destilada. Após diálise a amostra foi liofilizada, gerando a fração IC-6S, com rendimento de 53 mg.

5.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM *THETA*-CARRAGENANA (TC)

5.4.1 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO TC-6S ATRAVÉS DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE TC

A fração TC foi tratada com trietilamina para deixá-la na forma de sal de trietilamônio. Para a formação do sal, procedeu-se da seguinte forma: uma amostra de 2,0 g da resina catiônica (DOWEX 50x8) na forma de H⁺ foi lavada com água destilada até pH 5,5. Em seguida a resina lavada e seca foi incorporada a 40 mL de uma solução de trietilamina a 5%, sob agitação, por 16h, quando foi lavada com água destilada até pH 5,5. Uma amostra de 200 mg da fração TC (1 mg de carboidrato/10 mg de resina) foi solubilizada em 40 mL de água destilada, sendo incorporada, sob agitação, à resina previamente tratada com trietilamina. Após 16h, a solução com a resina foi filtrada em papel de filtro e lavada com água destilada até reação negativa ao fenol sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). O filtrado foi dialisado contra água destilada e liofilizado, gerando a fração TC-T. A amostra TC-T (50 mg)

foi solubilizada em 10 mL de DMF anidro. Em seguida adicionou-se 500 mg de SO₃-Py sob agitação magnética, a 20°C e 1 mL de 2M2B. O pH do meio foi corrigido para 7,0 com a adição de 0,1 mL de trietilamina. Após 1h a reação foi interrompida com banho de gelo e o polissacarídeo foi precipitado com etanol (3 volumes). Após centrifugação, o precipitado foi redissolvido em tampão fosfato, dialisado (membrana de 12-14 KDa) contra NaCl 1 M e água destilada. Após diálise a amostra foi liofilizada, gerando a fração TC-6S, com rendimento de 28 mg.

5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

5.5.1 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SULFATAÇÃO (DS)

O grau de sulfatação das carragenanas foi determinado através do método turbidimétrico descrito por Dodgson e Price (1962). Em 80 mL de água destilada aquecida (60–70°C) foram solubilizados 400 mg de gelatina (5 mg/mL). A solução foi mantida em refrigerador por 12h. Em seguida adicionou-se 400mg de cloreto de bário sob agitação vagarosa e novamente manteve-se sob refrigeração por mais 2h. Cada fração polissacarídica (10 mg) foi submetida a hidrólise, através da solubilização em 5 mL de ácido clorídrico 1 N (2 mg/mL) e aquecimento em estufa a 100°C por 5h. Cada fração hidrolisada (0,2 mL) foi tratada com 3,8 mL de ácido tricloroacético a 3% e com 1,0 mL de solução de cloreto de bário-gelatina. Após 15 minutos em temperatura ambiente, foi determinada a absorbância em espectrofotômetro (360 nm) para cada amostra (em triplicata). Para a calibração do aparelho foi utilizado uma solução “branco”, onde 0,2 mL da amostra foi substituído por 0,2 mL da solução de ácido clorídrico 1 N. O teor de sulfato foi determinado em relação a uma curva padrão de sulfato de sódio (20 a 180 µg/mL). O grau de substituição dos polissacarídeos foi calculado utilizando a seguinte fórmula (WHISTLER; SPENCER, 1964):

$$DS = 306,27 \times S/3200 - (102 \times S)$$

Onde:

306,27 = 1 mol da unidade repetitiva (G-DA)

3200 = massa atômica do enxofre (32 g) x 100

102 = representa 1 mol do éster substituinte (SO_3Na)

S = representa o teor de enxofre dado em porcentagem

5.5.2 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) DIFERENCIAL E ESPALHAMENTO DE LUZ EM MULTIÂNGULOS (MALLS)

As análises de homogeneidade das frações nativas e modificadas quimicamente foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) da marca WATERS, acoplado a um detector de índice de refração diferencial (IR) da marca WATERS, modelo 2410 e a um detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) da marca WYATT Technology, modelo DAWN DSP, com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas 4 colunas de gel filtração Ultrahydrogel™ 2000, 500, 250 e 120 acopladas em série, com limites de exclusão de $7,0 \times 10^6$, $4,0 \times 10^5$, $8,0 \times 10^4$ e $5,0 \times 10^3$, respectivamente. Como eluente, foi utilizada uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) 0,1 mol/L contendo azida de sódio (NaN_3) 0,2 g/L, com fluxo controlado de 0,5 mL/min. As amostras foram solubilizadas na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/mL e filtradas através de membrana de acetato de celulose (MILLIPORE®) com diâmetro médio dos poros de 0,22 μm . Uma quantidade de 100 μL de cada amostra foi injetada no aparelho. A taxa de variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc) foi determinada somente para as frações nativas, utilizando soluções de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg das amostras em 1 mL de NaNO_2 0,1 mol/L, contendo NaN_3 0,2 g/L. A determinação da massa molecular ponderal média (M_w) de cada fração nativa foi determinada a partir do perfil de eluição e valores de dn/dc . Os cálculos foram efetuados pelo *software* ASTRA. As massas moleculares das frações modificadas quimicamente foram estimadas através de regressão linear a partir de uma curva padrão elaborada com os logaritmos das massas moleculares das amostras nativas (calculadas previamente pelo *software* ASTRA) em função dos seus tempos de eluição.

5.6 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

5.6.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro BRUKER Avance DRX 400 operando na frequência base de 400 MHz e 100 MHz para os núcleos de ^1H e ^{13}C , respectivamente. Antes da análise, cada amostra foi solubilizada em água deuterada (D_2O), congelada e liofilizada, sendo este processo repetido por três vezes. Os experimentos foram realizados utilizando tubo de 5 mm de diâmetro externo e com concentrações que variaram de 25 a 60 mg/mL. Foram realizados experimentos de ^1H , ^{13}C , ^{13}C DEPT 135, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC. Os deslocamentos químicos foram determinados utilizando acetona como padrão interno: $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ para ^{13}C . Os deslocamentos da acetona foram determinados utilizando o 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio ($\delta = 0$ ppm para ^1H e ^{13}C) como padrão interno, conforme recomendações da IUPAC (VAN DEL VELDE, 2004).

5.6.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As análises de infravermelho foram realizadas no Departamento de Química da UFPR, em espectrômetro Bio-Rad, modelo FTS 3500GX, incorporado a transformada de Fourier. As amostras foram homogeneizadas com brometo de potássio (2 mg de polissacarídeo/100 mg de brometo de potássio) e prensadas para serem alisadas na forma de pastilhas. Os espectros foram adquiridos em 64 *scans* e os resultados foram analisados utilizando o software IR SEARCHMASTER 6.0 da Bio-Rad Corporation.

5.7 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *in vitro*

A atividade anticoagulante das frações modificadas quimicamente e das nativas foi avaliada pela determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT). O teste foi realizado no coagulômetro COAG-A-MATE XM da marca Organon Técnica, utilizando um *pool* de plasma humano normal, preparado a partir de sangue de doadores voluntários coletado em solução de citrato de sódio a 3,8% (9 partes de sangue para 1 parte de citrato).

5.7.1 TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (APTT)

Nos ensaios de APTT foram utilizadas as concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 100 e 150 µg de polissacarídeo/mL de plasma para todas as amostras. Foi realizado um teste com solução salina como controle negativo (determinação do tempo normal de coagulação) e como controle positivo foi utilizada a heparina não fracionada (202 UI/mg) nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 µg/mL. Foram incubados 90 µL de plasma com 10 µL de solução salina (controle), amostra, ou heparina, a 37 °C por 1 minuto, seguida por adição de 100 µL de cefalina de coelho e re-incubação por 2,5 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados 100 µL de cloreto de cálcio 0,025 M, para iniciar a coagulação. O tempo de coagulação foi determinado em duplicata para cada concentração, sendo repetido nos casos de diferença superior a 10% entre as análises. O coagulômetro foi programado para efetuar leituras até 300 s. O valor da concentração de cada polissacarídeo, necessário para dobrar o valor do APTT em relação à salina, foi calculado por regressão linear.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

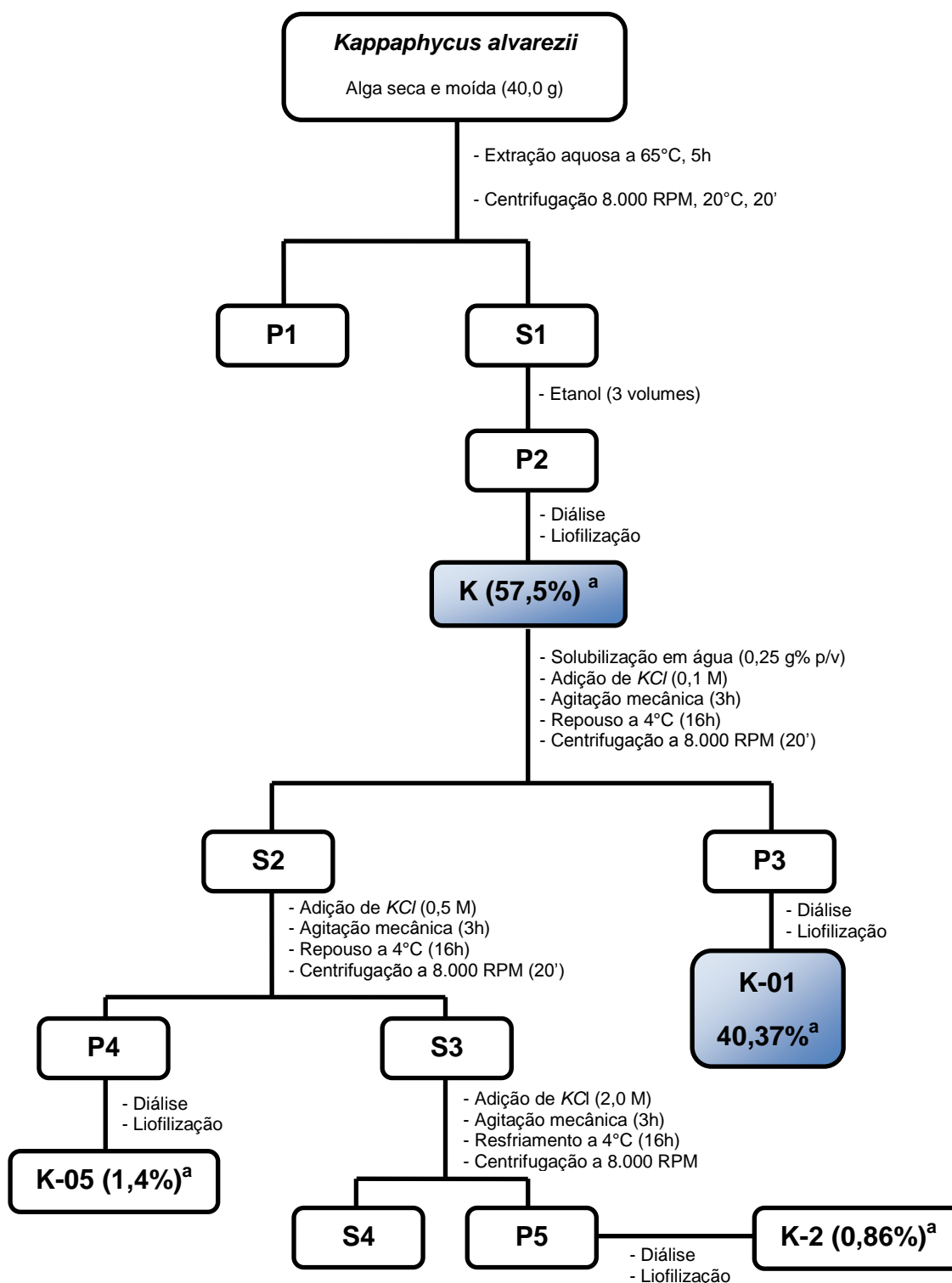
6.1 EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DA ALGA *Kappaphycus alvarezii* E SEPARAÇÃO DA KAPPA-CARRAGENANA POR TRATAMENTO COM CLORETO DE POTÁSSIO

A alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* biosintetiza um conjunto de galactanas sulfatadas, composto principalmente pela *kappa*-carragenana (ESTEVES; CIANCIA; CEREZO, 2004). Neste trabalho esta carragenana foi obtida através da extração aquosa a 65°C da alga seca e moída. Após centrifugação, o sobrenadante foi precipitado com 3 volumes de etanol. O precipitado foi redissolvido em água destilada, dialisado e liofilizado, gerando a fração K, com rendimento de 57,5% em relação ao peso seco da alga (40 g). Esta fração foi submetida a tratamento com KCl em concentrações de 0,1 a 2 M, com o objetivo de precipitar uma fração que contenha majoritariamente a *kappa*-carragenana (Figura 10).

A principal propriedade físico-química das carragenanas é a sua capacidade de gelificação na presença de íons positivos. A capacidade geleificante envolve a formação de dupla hélice entre as cadeias de galactose. Dentre outros requisitos, a formação da dupla hélice requer que as cargas negativas oriundas dos grupamentos sulfato, presentes em praticamente todas as carragenanas nativas, sejam neutralizadas (PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003). Assim, quanto maior o número de grupamentos sulfatos presentes na molécula, maior a quantidade de íons positivos necessários para a precipitação. Isso explica o fato da *kappa*-carragenana, com somente um substituinte sulfato, precipitar com uma concentração menor de KCl que a *iota*-carragenana que possui dois, justificando a metodologia de separação utilizando esse sal.

FIGURA 10 - EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE *Kappaphycus alvarezii* E SEPARAÇÃO DAS CARRAGENANAS POR TRATAMENTO COM CLORETO DE POTÁSSIO

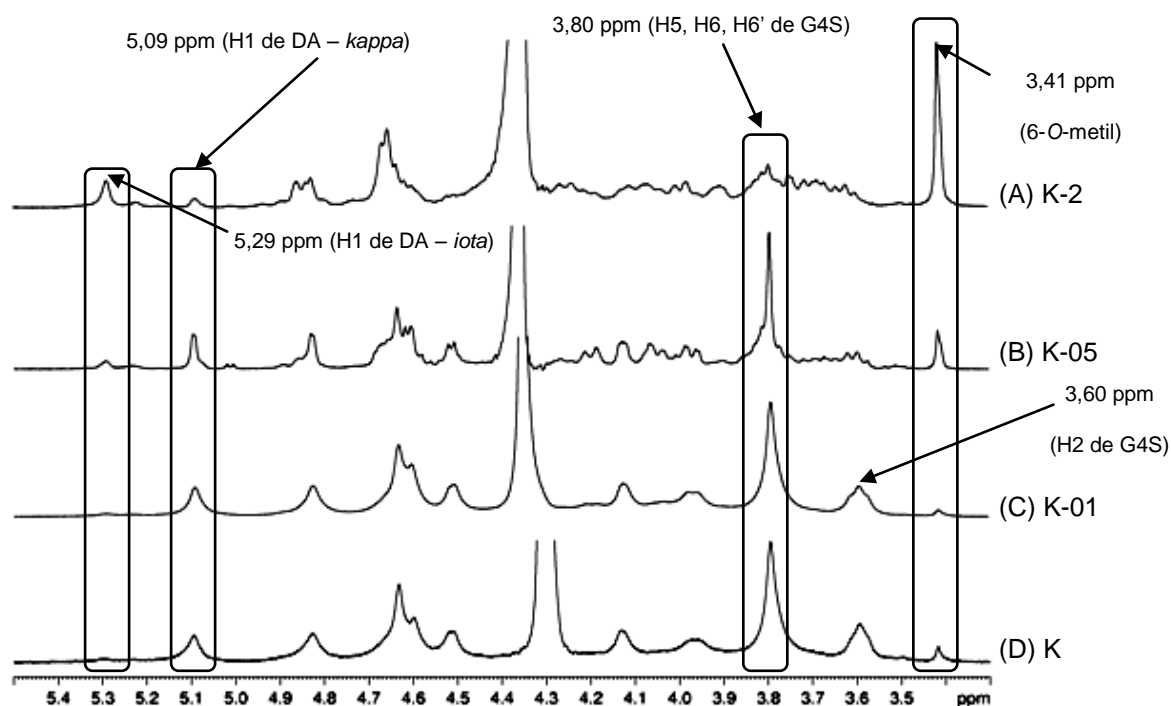
S = Sobrenadante; P = Precipitado; ^a em relação ao peso seco da alga



A fração nativa K e as sub-frações K-01, K-05 e K-2 foram analisadas por RMN. O espectro de ^1H da fração K (Figura 11, D) mostra a presença da *kappa*- e *iota*-carragenana, indicadas pelos sinais α -anoméricos em 5,09 e 5,29 ppm, respectivamente, além de uma quantidade significativa de unidades de 6-O-metil- β -D-galactopiranosose-4-sulfato, indicadas pelo sinal em 3,41 ppm correspondentes ao grupo metil (ESTEVES; CIANCIA; CERESO, 2004). Após o tratamento com cloreto de potássio, verificou-se, através de RMN ^1H , que a fração K-01 (Figura 11, C), precipitada com 0,1 M de KCl, apresenta acima de 90% de díades de *kappa*- e cerca de 8% de *iota*-carragenana, co-precipitada nesta fração. Esses valores foram estimados através da integração dos prótons α -anoméricos. Esta fração é a que apresenta o maior grau de pureza para a *kappa*-carragenana. O espectro da fração K-05 (Figura 11, B), precipitada com 0,5 M de KCl, mostra que há uma mistura de polissacarídeos na fração, observada pela quantidade de sinais no espectro. Entre esses sinais, aparecem os anoméricos da *kappa*-, *iota*- e *nu*-carragenana, em 5,09, 5,29 e 5,24 ppm respectivamente (VAN DE VELDE; ROLLEMA, 2008). Verifica-se também um aumento na intensidade do sinal em 3,41 ppm (6-O-metil- β -D-galactopiranosose-4-sulfato). O espectro da fração K-2 (Figura 11, A), precipitada com 2 M de KCl, mostra os mesmos sinais da fração K-05, mas com intensidades diferentes. Observa-se claramente que o sinal em 5,29 ppm de *iota*-carragenana aumentou de intensidade, indicando a presença dessa carragenana em maior quantidade que naquelas frações anteriores. O espectro também mostra uma pequena quantidade de *kappa*-carragenana e grande quantidade de unidades de 6-O-metil- β -D-galactopiranosose-4-sulfato, observada pela diminuição do sinal de H5 e H6 de G4S da *kappa*- e *iota*-carragenana em 3,80 ppm e aumento significativo na intensidade do sinal em 3,41 ppm.

FIGURA 11 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN ^1H DA FRAÇÃO K (D) E SEUS PRODUTOS DE PRECIPITAÇÃO APÓS TRATAMENTO COM KCl

Solvente: D_2O (K-01 = 70°C ; demais amostras = 60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde e Rollema (2008)

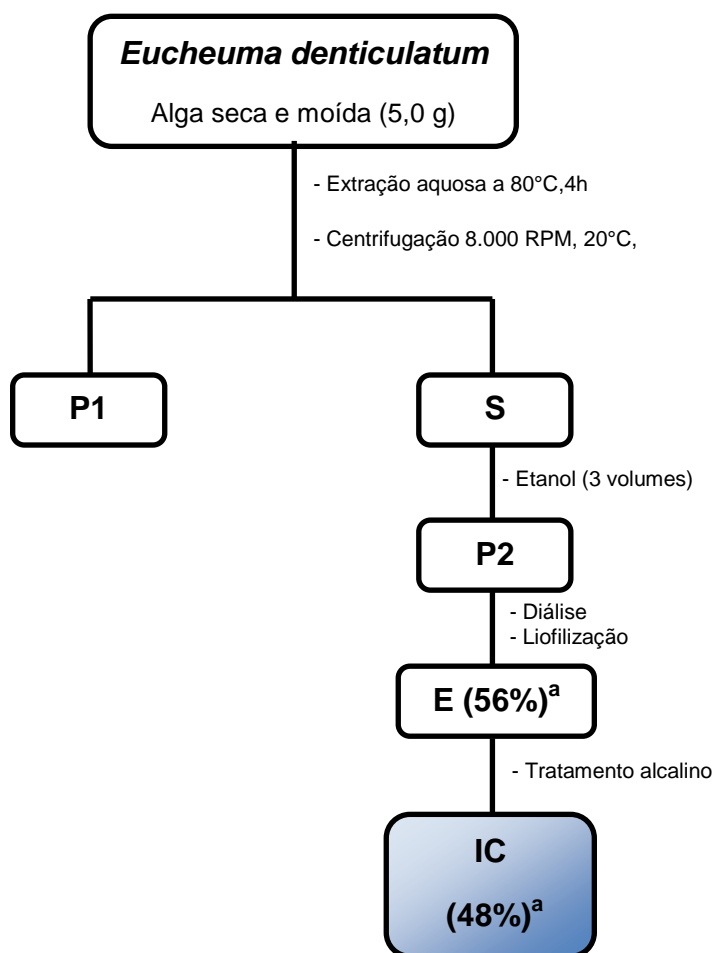


6.2 EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DA ALGA *Eucheuma denticulatum* E TRATAMENTO ALCALINO PARA OBTENÇÃO DE IOTA-CARRAGENANA (IC)

A alga *Eucheuma denticulatum* seca e moída (5,0 g) foi submetida à extração aquosa a 80°C . Após centrifugação, os polissacarídeos foram precipitados com etanol (3 volumes). O precipitado foi redissolvido em água destilada, dialisado e liofilizado, gerando a fração E (Figura 12). O rendimento dos polissacarídeos em relação ao peso seco da alga foi de 56%.

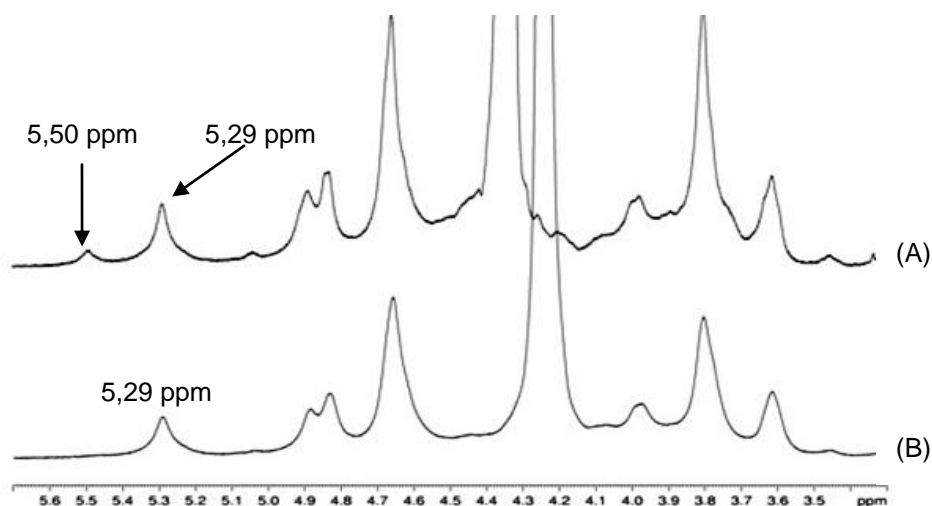
FIGURA 12 - EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DA ALGA *Eucheuma denticulatum* E TRATAMENTO ALCALINO PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO IC

S = sobrenadante; P = precipitado; ^a em relação ao peso seco da alga



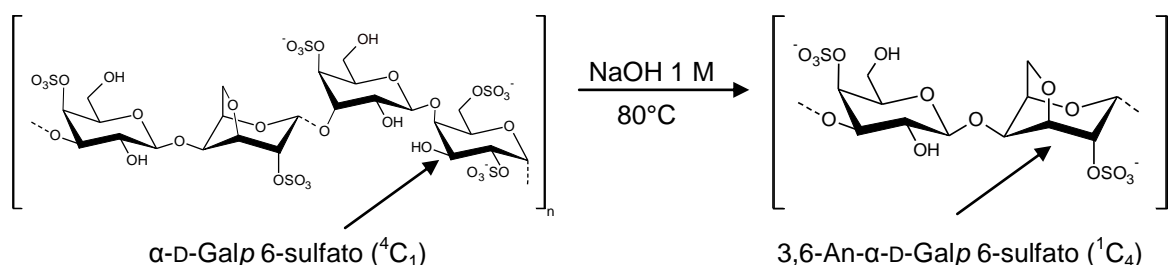
A alga *Eucheuma denticulatum* sintetiza, como principal polissacarídeo, um híbrido de *iota/nu*-carragenana, como verificado no espectro de RMN ^1H da fração E (Figura 13, A). A análise permitiu identificar e quantificar o teor de G4S-DA2S (71%) e seu precursor G4S-D2S,6S (29%), através da integração e relação entre os sinais anoméricos das unidades D2S,6S e DA2S.

FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO IC (B) OBTIDA ATRAVÉS DE TRATAMENTO ALCALINO DA FRAÇÃO E (A)
 Solvente: D_2O ; acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm - referente ao DSS em $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde e Rollema (2008)



Com o objetivo de diminuir o teor de *nu*-carragenana (G4S-D2S,6S) e consequentemente aumentar o teor de *iota*-carragenana (G4S-DA2S), a fração E foi reduzida com NaBH_4 e submetida a tratamento alcalino (NaOH 1 M, 80°C , 30 minutos) segundo metodologia descrita por Ciancia *et al.* (1993), dando origem a fração IC (Figura 13, B). A formação da ligação 3,6-anidro ocorre através da eliminação do grupo sulfato de C-6 das unidades de α -D-galactopirranose 2,6-dissulfato em meio alcalino (Figura 14). A formação da ligação ocorre em dois passos: primeiramente o hidróxido de sódio (NaOH) desprotona as hidroxilas, produzindo ânions alcóxidos. A α -D-galactopirranose 2,6-dissulfato passa da conformação $^4\text{C}_1$ (6-OSO₃ - equatorial) para $^1\text{C}_4$ (6-OSO₃ - axial). Este passo coloca o C6 sulfatado e o alcóxido de C3 nas posições *cis* axiais. O segundo passo consiste no ataque nucleofílico do alcóxido de C3 ao C6, resultando na formação da ligação 3,6-anidro na mesma unidade de galactose e liberação do grupo sulfato de C6 (DE RUITER; RUDOLPH, 1997). O rendimento do tratamento alcalino ficou em 48%.

FIGURA 14 - REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO DAS UNIDADES D2S,6S DAS DÍADES DE *NU*-CARRAGENANA PRESENTES NA FRAÇÃO E PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO IC



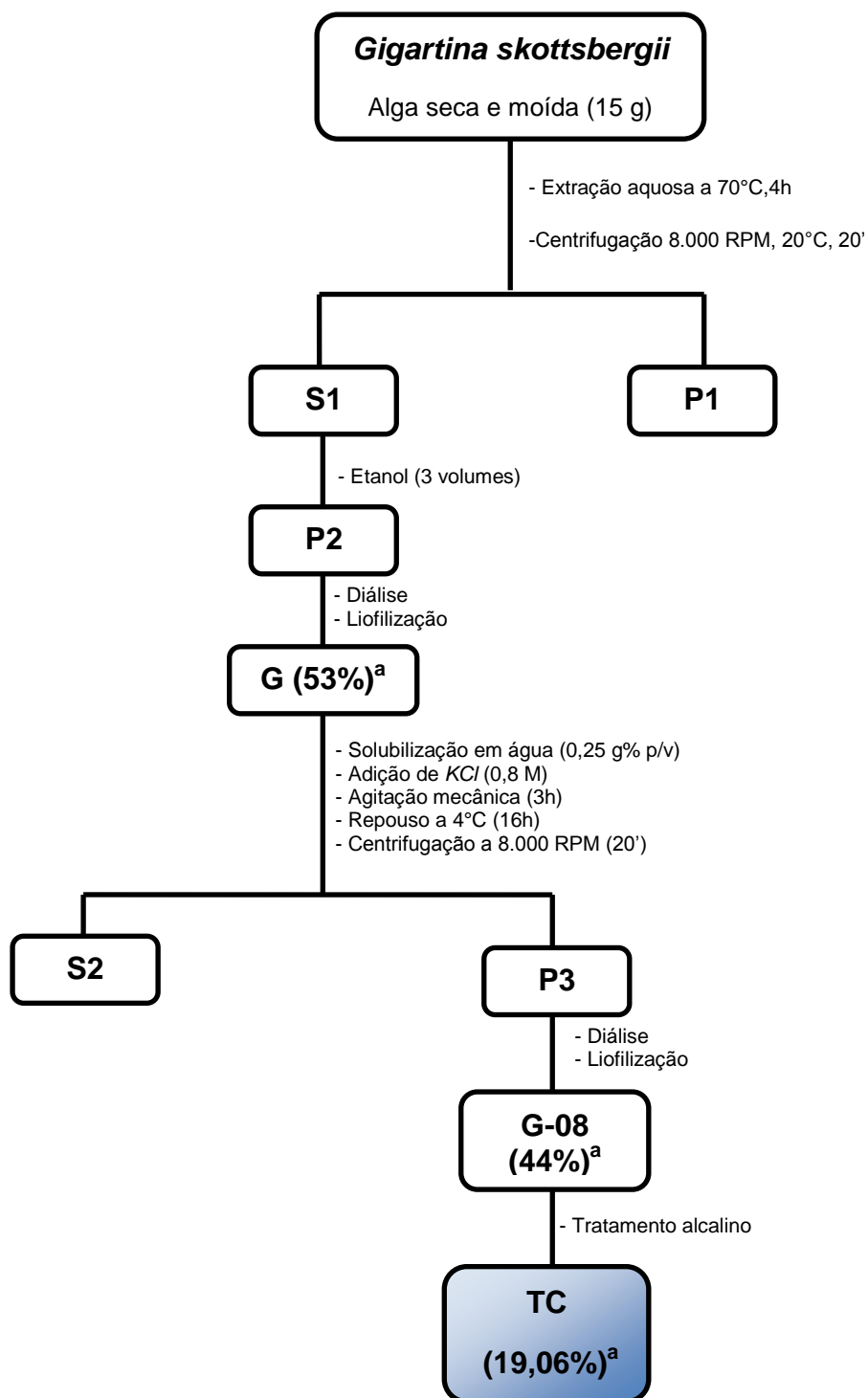
A fração IC foi analisada por RMN de ^1H (Figura 13, B). O sinal anomérico, em 5,50 ppm, das unidades de $\alpha\text{-D-galactopiranosse 2,6-dissulfato}$ (*nu*-carragenana) desapareceu, restando apenas o sinal em 5,29 ppm (VAN DE VELDE; ROLLEMA, 2008) correspondente ao próton anomérico das unidades de 3,6-anidro- $\alpha\text{-D-galactopiranosse 2-sulfato}$ (*iota*-carragenana).

6.3 EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DA ALGA *Gigartina skottsbergii*, SEPARAÇÃO DA Λ -CARRAGENANA POR TRATAMENTO COM CLORETO DE POTÁSSIO E TRATAMENTO ALCALINO PARA OBTENÇÃO DE Θ -CARRAGENANA (TC)

A alga *Gigartina skottsbergii* sintetiza como principal polissacarídeo a *lambda*-carragenana (G2S-D2S,6S), utilizada neste trabalho como substrato para a obtenção da *theta*-carragenana (G2S-DA2S). A alga seca e moída foi submetida à extração aquosa a 70°C e precipitada com etanol (Figura 15). O precipitado foi redissolvido em água destilada, dialisado e liofilizado, gerando a fração G, com rendimento de 53% em relação ao peso seco da alga. A fração G foi solubilizada em água destilada e tratada com KCl até concentração 0,8 M (NOSEDA, 1994), com o intuito de separar a *lambda*-carragenana dos demais polissacarídeos presentes na fração. A fração gerada após esse procedimento foi denominada de G-08, com rendimento de 44% em relação ao peso seco da alga.

FIGURA 15 - EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE *Gigartina skottsbergii* (G), SEPARAÇÃO DA LAMBDA-CARRAGENANA (G-08) COM CLORETO DE POTÁSSIO E TRATAMENTO ALCALINO PARA OBTENÇÃO DE THETA-CARRAGENANA (TC)

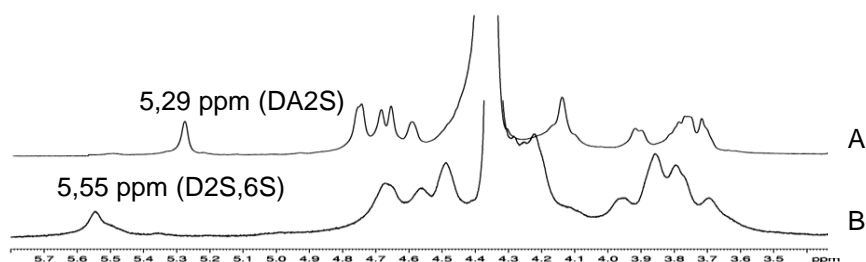
S = sobrenadante; P = precipitado. ^a em relação ao peso seco da alga



Com o objetivo de converter as unidades de α -D-galactopiranosose 2,6-dissulfato (*lambda*-carragenana) em 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (*theta*-carragenana), a fração G-08 foi submetida a tratamento alcalino (NaOH 1M, 80°C, 28h), de acordo com a metodologia descrita por Doyle *et al.* (2010), dando origem a fração TC (Figura 15). A formação da ligação 3,6-anidro ocorreu através da eliminação do grupo sulfato de C6 das unidades de α -D-galactopiranosose 2,6-dissulfato em meio alcalino, conforme mecanismo descrito no item 6.2. O rendimento do tratamento alcalino ficou em 25,3% em relação ao peso seco da alga.

As frações G-08 e TC foram analisadas por RMN. O espectro de ^1H , mostra o desaparecimento do sinal em 5,55 ppm, referente ao H1 de D2S,6S (GUIBET *et al.*, 2006), na fração G-08 (Figura 16, B) e o surgimento de um sinal de grande intensidade em 5,29 ppm em TC, que corresponde ao próton anomérico das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (Figura 16, A), como era esperado para a essa fração constituída pela díade G2S-DA2S.

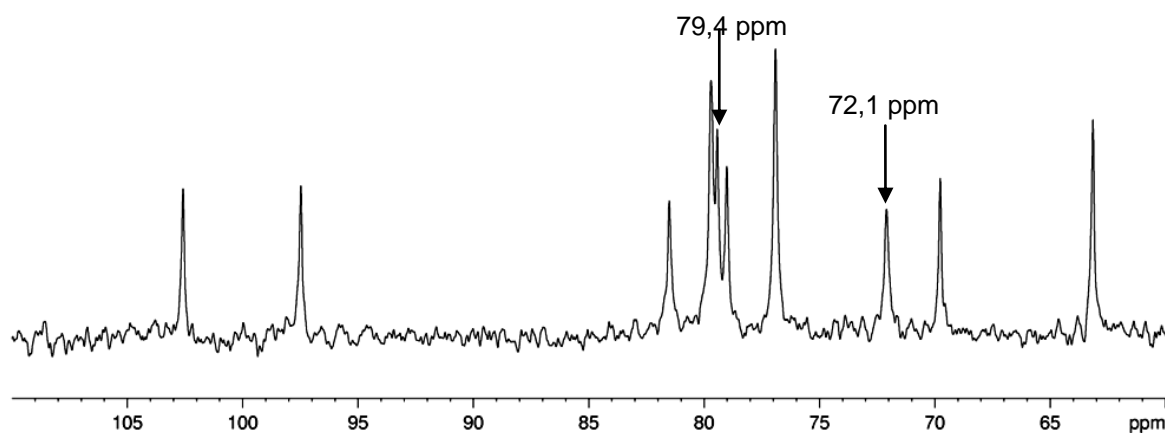
FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO TC (A) OBTIDA A PARTIR DO TRATAMENTO ALCALINO DA FRAÇÃO G-08 (B)
Solvente: D₂O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde e Rollema (2008)



A figura 17 mostra o espectro de RMN ^{13}C da fração TC, onde se observa os sinais de C3 e C6 de DA2S em 79,4 e 72,1 ppm, respectivamente (VAN DE VELDE; ROLLEMA, 2008).

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO TC OBTIDA APÓS TRATAMENTO ALCALINO DA FRAÇÃO G-08

Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008)



A análise de HSQC (Figura 18) em conjunto com dados da literatura permitiu o completo assinalamento da *theta* carragenana (Tabela 2).

A amostra TC foi analisada por espectroscopia de infravermelho. O espectro, idêntico ao obtido por Doyle *et al.* (2010), mostra três características da conversão da *lambda*- em *theta*-carragenana (Figura 19). A primeira é a ausência da banda de absorção em 820 cm^{-1} , típica de C6-O-S da unidade D2S,6S, presente em *lambda*-carragenana. A segunda é a presença de uma banda em 805 cm^{-1} , característica de C2-O-S em 3,6-anidrogactose, presente em *theta*- e ausente em *lambda*-carragenana. E a terceira é a presença de uma banda em 930 cm^{-1} referente à ponte 3,6-anidrogactose. Esses dados confirmam a conversão da *lambda*- em *theta*-carragenana, corroborando com a análise de RMN.

FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO TC

Solvente: D₂O; acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C , respectivamente - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008). As correlações $79,4/4,75$ e $72,1/4,14$ correspondem a C3/H3 e C6/H6 de DA2S, respectivamente.

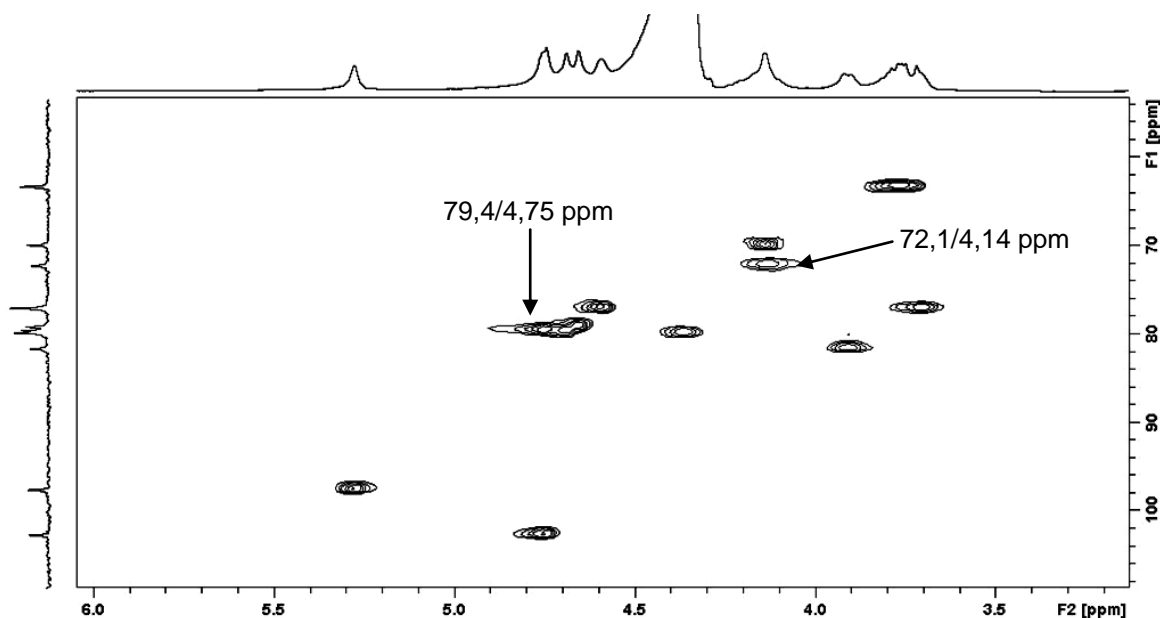
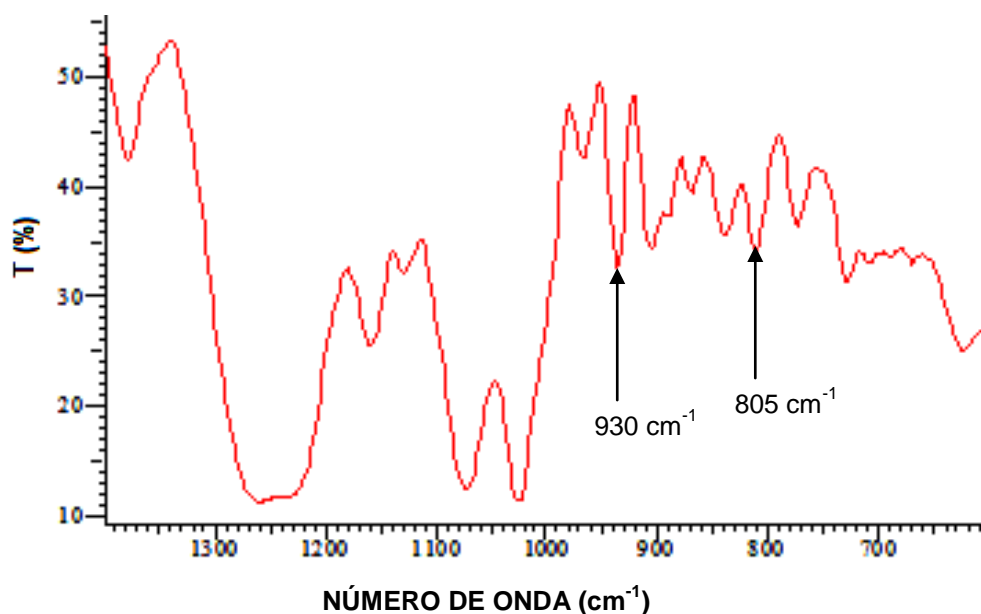


TABELA 2 - ASSINALAMENTOS DE RMN ^1H E ^{13}C DA FRAÇÃO TC, OBTIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE POR HSQC

FRAÇÃO	UNIDADE ^a	Deslocamentos químicos (ppm) ^b					
		C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6; H6'
TC	G2S	102,6	79,7	81,5	69,8	76,9	63,2
		4,76	4,37	3,91	4,14	3,71	3,77; 3,77
	DA2S	97,5	76,9	79,4	79,7	79,0	72,1; 4,14
		5,29	4,60	4,75	4,70	4,66	

^a Os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994); ^b referentes ao padrão interno acetona ($\delta = 2,208$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente), calibrado com DSS em $0,00$ ppm, Van de Velde e Rollema (2008)

FIGURA 19 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO TC
Região entre 1400 e 600 cm^{-1}



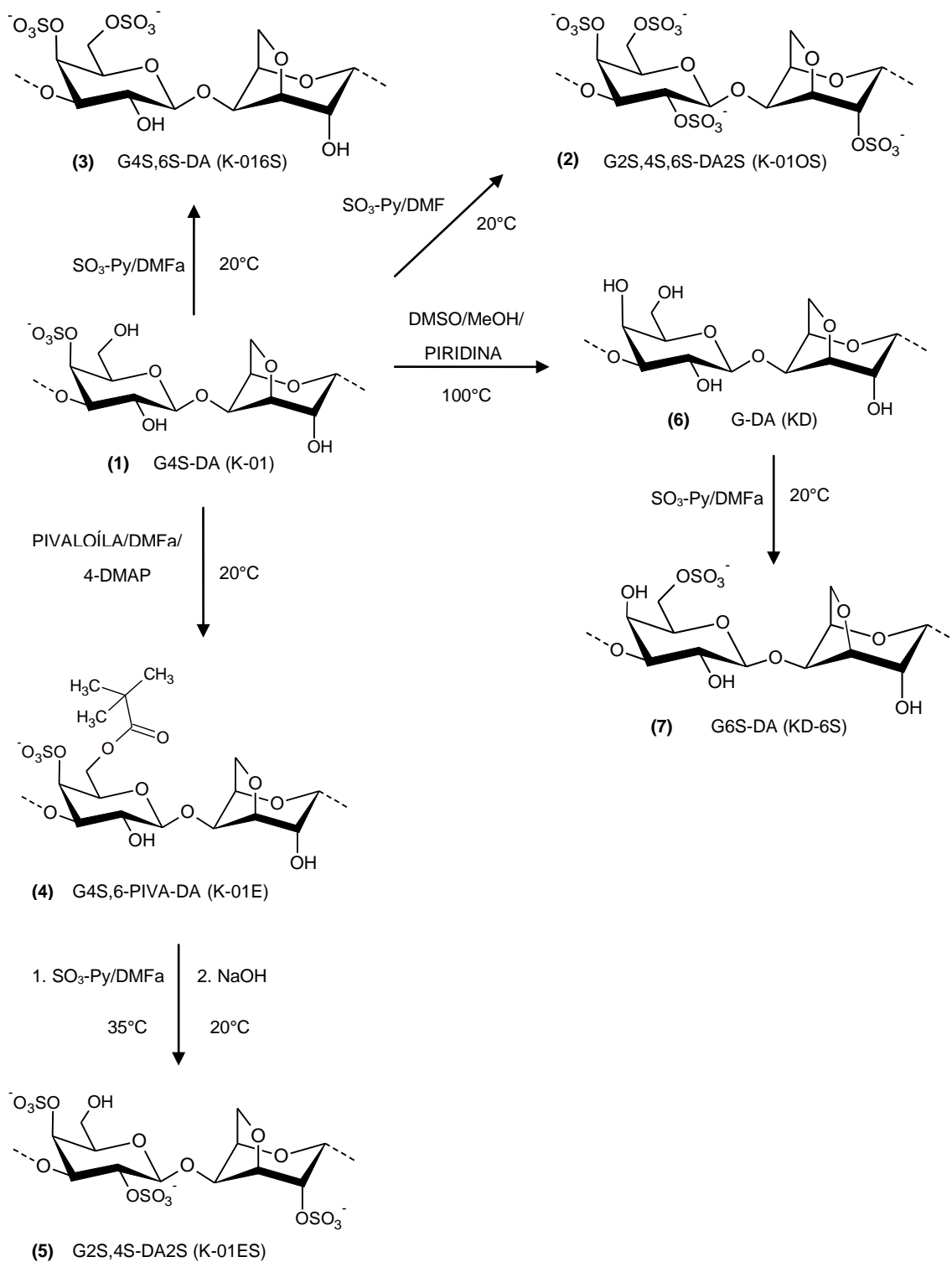
6.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM *KAPPA*-CARRAGENANA (K-01)

A fração K-01 (*kappa*-carragenana) foi submetida a modificações químicas com o objetivo de obter polímeros com diversos padrões de sulfatação. Este polímero apresenta uma estrutura dissacarídica repetitiva (Figura 20, 1) constituída de unidades de (1→3) β -D-galactopiranosose-4-sulfato (G4S) e (1→4) α -D-3,6-anidrogallactopiranosose (DA), com hidroxilas livres nas posições de C6 e C2 das unidades de G4S e C2 de DA. Nesse polímero foi possível realizar uma persulfatação, através da formação de ésteres de sulfato em todas as hidroxilas livres da díade (Figura 20, 2) e sulfatações seletivas nas hidroxilas ligadas a C6 de G4S e G (Figura 20, 3 e 7) e nas hidroxilas ligadas a C2 das unidades G4S e DA (Figura 20, 5).

A entrada do grupamento sulfato em cada posição na estrutura foi monitorada através da espectroscopia por RMN ^1H . Nas modificações da fração K-01, o monitoramento foi feito através da integração, no espectro, da área dos sinais na

região de 5,09 ppm (H1 das unidades de DA), de 3,80 ppm (H6, H6' e H5 das unidades de G4S) e de 3,60 ppm (H2 de G4S), estabelecendo uma relação entre os sinais 3,80/5,09 (3:1) e 3,60/5,09 (1:1). A entrada de um grupamento sulfato em C6 submete os dois prótons ligados a esse carbono e o próton ligado a C5 a um novo ambiente químico, causando o deslocamento do sinal de 3,80 ppm para outro campo. Dessa forma, quanto maior for a sulfatação seletiva em C6, menor será o sinal em 3,80 ppm e a relação 3,80/5,09. Do mesmo modo, a entrada de um grupamento sulfato em C2 de G4S, causa o deslocamento do sinal em 3,60 ppm, diminuindo o sinal no espectro e a relação 3,60/5,09. A sulfatação de C2 de DA causa a diminuição do sinal em 5,09 ppm e aparecimento de sinais entre 5,29 e 5,35 correspondentes a H1 das unidades de DA2S (USOV, 1984; VAN DE VELDE; ROLLEMA, 2008).

FIGURA 20 - ESQUEMA DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM K-01 (1) PARA OBTENÇÃO DE SEUS PRODUTOS DE SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 (3 E 7); SULFATAÇÃO SELETIVA EM C2 (4 E 5); PERSULFATAÇÃO (2) E DESSULFATAÇÃO (6)



6.4.1.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SULFATAÇÃO DA FRAÇÃO K-01 PARA A OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES K-01OS E K-016S

No primeiro protocolo de sulfatação em K-01 (Tabela 3, entrada 2) foi utilizada a fração K-01 na forma de sal de trietilamônio com a finalidade de melhorar a solubilidade do polímero no solvente DMFa. Como agente sulfatante foi utilizado o complexo trióxido de enxofre-piridina ($\text{SO}_3\text{-Py}$) e para evitar a degradação do polímero, acrescentou-se o 2-metil-2-buten-1-ol (PAPY-GARCIA *et al.*, 2005). O tempo de reação foi de 7h, com o pH mantido em 4,5 durante todo o processo.

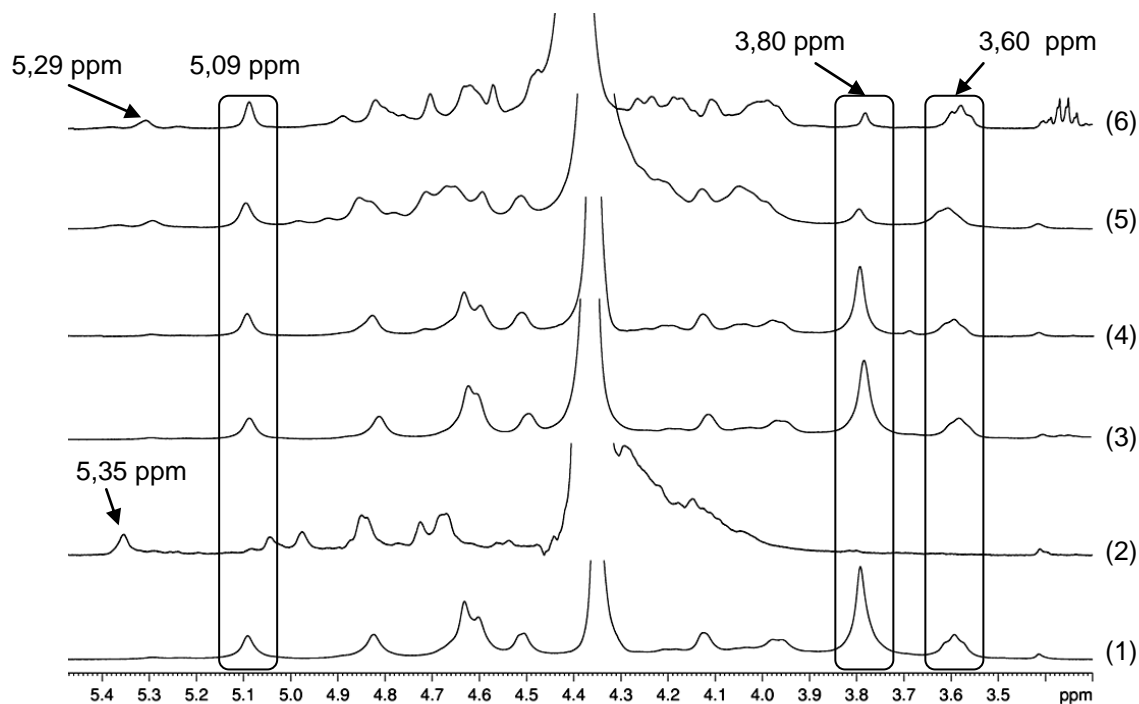
TABELA 3 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PERSULFATAÇÃO E SULFATAÇÃO SELETIVA DA FRAÇÃO K-01

Entrada	Agente sulfatante ^a	Condição da reação ^b	Relação 3,60/5,09 ^c	Relação 3,80/5,09 ^c	Relação 5,29/5,09 ^c	Relação 5,35/5,09 ^c
1 ^d	-	-	1,2	3,5	0,1	-
2 ^e	$\text{SO}_3\text{-Py}$	500 mg/DMFa/7h	nd ^f	nd ^f	nd ^f	nd ^f
3 ^d	$\text{SO}_3\text{-Me}_3\text{N}$	500 mg/ H_2O /24h	1,4	3,7	0,1	-
4 ^d	$\text{SO}_3\text{-Me}_3\text{N}$	500 mg/DMFa/24h	1,1	3,0	0,1	-
5 ^d	$\text{SO}_3\text{-Py}$	500 mg/DMFa/1h	1,2	0,7	0,3	0,1
6 ^d	$\text{SO}_3\text{-Py}$	500 mg/DMFa/8h	1,4	0,6	0,4	0,1

^a $\text{SO}_3\text{-Py}$ = complexo trióxido de enxofre-piridina. $\text{SO}_3\text{-Me}_3\text{N}$ = complexo trióxido de enxofre-trimetilamina; ^b Em todas as condições (exceto na condição 2), o pH foi mantido em 7,0 com a adição de trietilamina. Todas as reações foram realizadas a 20°C; ^c Intensidade relativa ao sinal em 5,09 ppm. Integrações foram realizadas através de análises de RMN ^1H ; ^d *Kappa*-carragenana (K-01) foi utilizada na forma de sal de sódio; ^e *Kappa*-carragenana (K-01) foi utilizada na forma de sal de trietilamônio; ^f nd = não detectado. Apenas um sinal em 5,35 ppm foi observado. Em todas as reações utilizou-se 50 mg do polissacarídeo.

O produto formado foi analisado por RMN ^1H (Figura 21, 2). O espectro da amostra evidencia a ausência dos sinais em 3,80 e 3,60 ppm, indicando a sulfatação em C6 e C2 de G4S. O espectro também mostra, na região anomérica, um sinal de grande intensidade 5,35 ppm, indicando a sulfatação em C2 de DA. A análise desses dados permite afirmar que, utilizando esse protocolo, houve persulfatação do polímero, atribuída, provavelmente, a utilização do polissacarídeo na forma de sal de trietilamônio.

FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN ^1H DA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 E PERSULFATAÇÃO DE K-01
 Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm para ^1H - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008). (1) = K-01; (2) a (6) = condições 2 a 6 da tabela 3



A análise dos resultados do primeiro protocolo de sulfatação contribuiu para a elaboração de um segundo, onde as condições de reação foram abrandadas, objetivando a sulfatação seletiva em C6. Nesse protocolo (Tabela 3, entrada 3) houve variação em todos os parâmetros da reação anterior, com o intuito de diminuir a reatividade do agente sulfatante e direcionar a introdução do grupamento sulfato para a posição desejada. Para isso, o polímero K-01 (contra-íon Na^+) foi solubilizado em água destilada (GILBERT, 1965) e submetido à sulfatação com o $\text{SO}_3\text{-Me}_3\text{N}$, por 24h. A trimetilamina é uma base mais forte que a piridina, tornando o trióxido de enxofre menos reativo. A análise por RMN ^1H (Figura 21, espectro 3) mostrou que não houve sulfatação no polímero, pois não há evidência da diminuição do sinal em 3,80 ppm, nem na relação 3,80/5,09 comparando-se a integração das áreas desse sinal (Tabela 3, entrada 3) com a da fração K-01 (Tabela 3, entrada 1).

Para melhorar a condição 3, mudou-se o solvente da reação para DMFa (Tabela 3, entrada 4). A análise por RMN ^1H (Figura 21, espectro 4) mostrou que houve sulfatação em baixo grau no polímero, evidenciada por uma pequena diminuição no sinal em 3,80 ppm e na relação 3,80/5,09 de 3,5 para 3,0. Nas condições 5 e 6, substituiu-se o $\text{SO}_3\text{-Me}_3\text{N}$ por $\text{SO}_3\text{-Py}$ como agente sulfatante, mantendo o DMF anidro como solvente. A única diferença entre elas foi o tempo de reação (1 e 8h, respectivamente). O produto formado após 1h de reação foi analisado por RMN ^1H (Figura 21, espectro 5). O espectro mostra a diminuição significativa do sinal em 3,80 ppm e da relação 3,80/5,09 (de 3,5 para 0,7), indicando a entrada de grupamento sulfato em C6 (Tabela 3, entrada 5). Na região anomérica houve um pequeno aumento na intensidade do sinal em 5,29 ppm, indicando a sulfatação em C2 de DA. Outro sinal α -anomérico de baixa intensidade surgiu em 5,35 ppm e foi assinalado como H1 de DA2S ligado a G2S,4S ou G2S,4S,6S. A análise dos dados em conjunto sugere que o produto é formado por polímeros constituídos principalmente pela díade repetitiva G4S,6S-DA. Entretanto, foram detectados também a presença de díades com C2 de G4S e DA sulfatadas em menor proporção. O espectro do produto formado na condição de reação 6 (Figura 21, espectro 6) mostra que o sinal em 3,80 ppm diminuiu em relação à condição 5, assim como a relação 3,80/5,09 (de 3,5 para 0,6), indicando a sulfatação em C6. Por outro lado, houve aumento na intensidade do sinal em 5,29 ppm, significando aumento na sulfatação de C2 de DA. Dessa forma, de todos os protocolos testados, a melhor condição encontrada para a sulfatação seletiva em C6 foi a descrita na tabela 3, entrada 5, com a formação majoritária do produto seletivamente sulfatado em G4S,6S-DA (55%), sendo 45% de outras díades (Tabela 4).

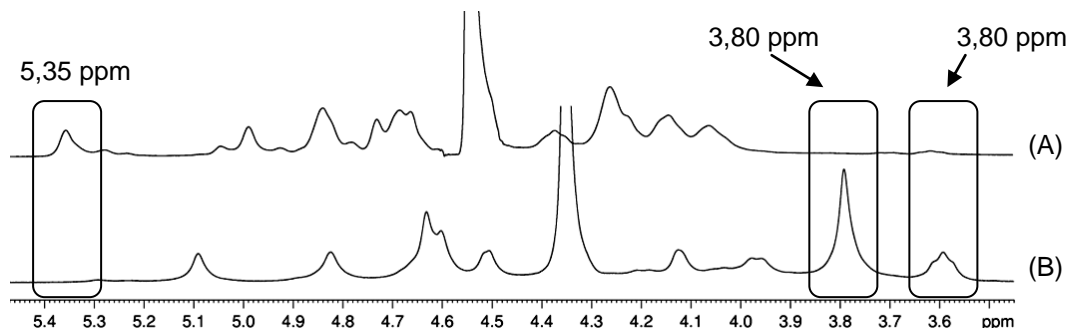
Uma vez estabelecidas às melhores condições de persulfatação e sulfatação seletiva em C6, foram feitas reações preparativas com o objetivo de obter as frações sulfatadas em quantidades suficientes para os ensaios de caracterização e atividade biológica.

6.4.2 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS FRAÇÕES K-01OS E K-016S

Os produtos formados nas reações preparativas de persulfatação (K-01OS) e sulfatação seletiva em C6 (K-016S) foram caracterizados por análises de RMN e infravermelho.

Assim como na reação de otimização (Figura 21, 2), o espectro de ^1H do produto K-01OS (Figura 22, 2) mostra a ausência de sinal em 3,80 ppm (H5 e H6 de G4S), evidenciando a sulfatação em C6.

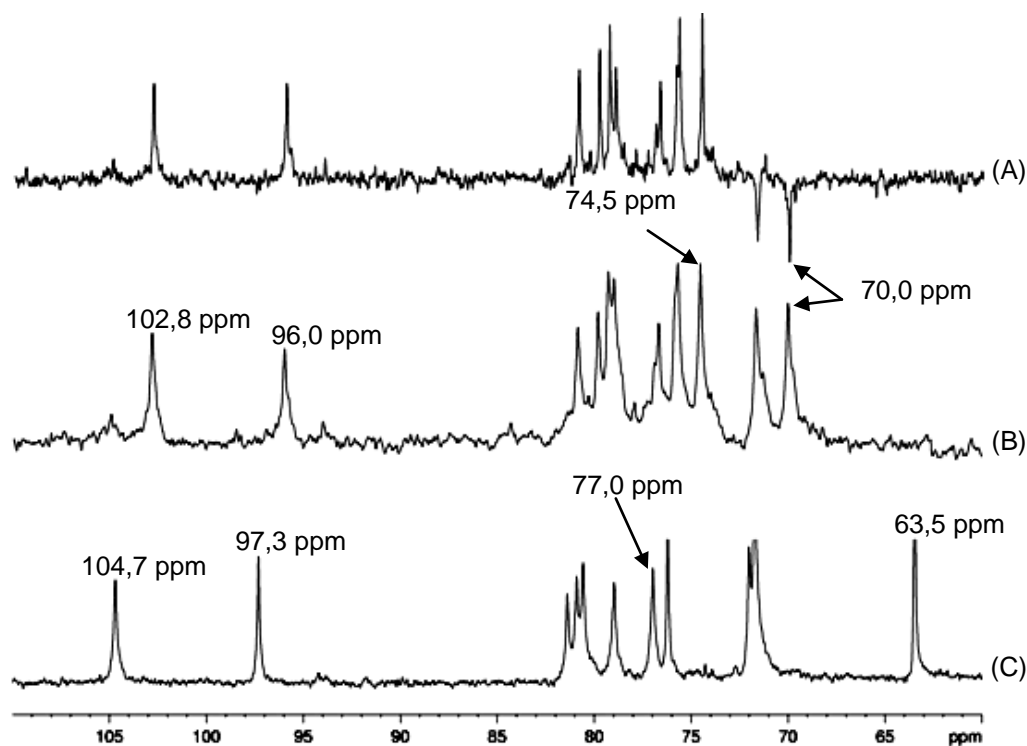
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA REAÇÃO PREPARATIVA PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01OS (A) A PARTIR DA PERSULFATAÇÃO DE K-01 (B)
Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm para ^1H - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008)



No espectro de ^{13}C (Figura 23, B) foi observado o desaparecimento do sinal de C6 de G4S em 63,5 ppm e o deslocamento do sinal de C5 de 77,0 para 74,5 ppm. O sinal de C6 de G4S,6S aparece em 70,0 ppm (TÀNANH, *et al.*, 2001), confirmado pelo sinal invertido em DEPT 135 (Figura 23, A). No espectro de ^1H verifica-se também a diminuição significativa do sinal em 3,60 ppm, indicando sulfatação em C2 de G4S, evidenciada no espectro de ^{13}C pela diminuição do sinal em 71,7 ppm (C2 de G4S) e aumento no sinal em 79,1 ppm referente a C2 de G2S,4S,6S (TÀNANH, *et al.*, 2001).

FIGURA 23 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN ^{13}C DEPT (A) E ^{13}C (B) DA FRAÇÃO K-01OS OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DE K-01 (C)

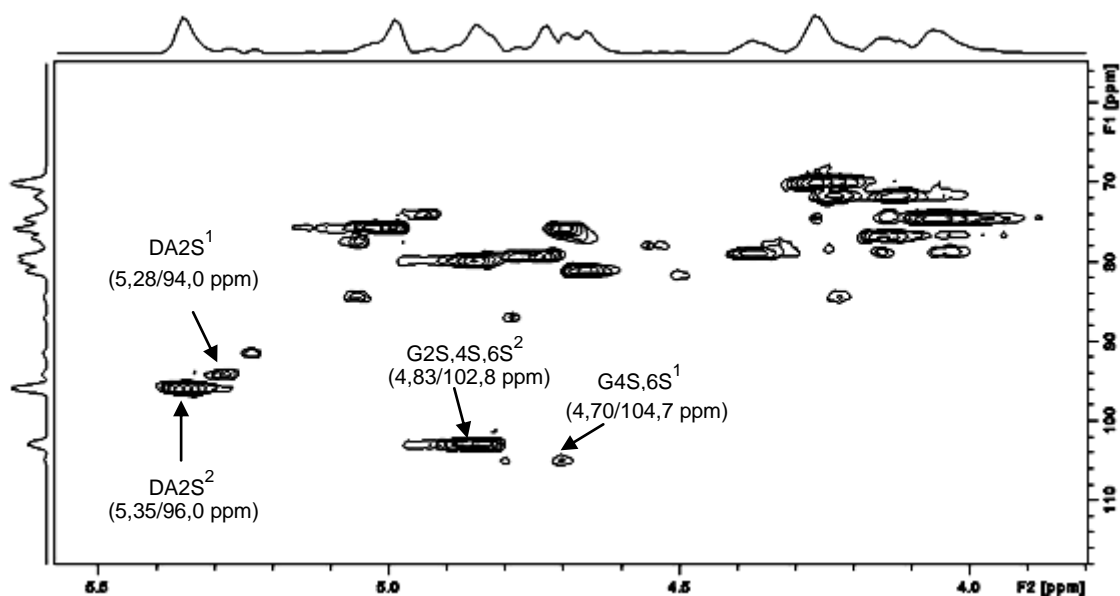
Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008)



No espectro de HSQC (Figura 24), são observadas duas correlações de grande intensidade na região anomérica, determinantes para a elucidação da díade majoritária da fração K-01OS, como a 4,83/102,8 ppm (H1/C1 de G2S,4S,6S) e 5,35/96,0 ppm (H1/C1 de DA2S). A ausência de correlação entre 3,80/63,5 e 3,80/77,0 ppm (H6/C6 e H5/C5 de G4S, respectivamente) confirma a sulfatação total em C6 de G4S e permite afirmar que as correlações em menor intensidade em 5,28/94,0 e 4,70/104,7 ppm estão relacionadas às unidades de H1/C1 de DA2S e H1/C1 de G4S,6S, respectivamente. Os assinalamentos obtidos através de RMN HSQC estão ilustrados na tabela 4.

FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO K-01OS

Solvente: D₂O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C , respectivamente - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008)

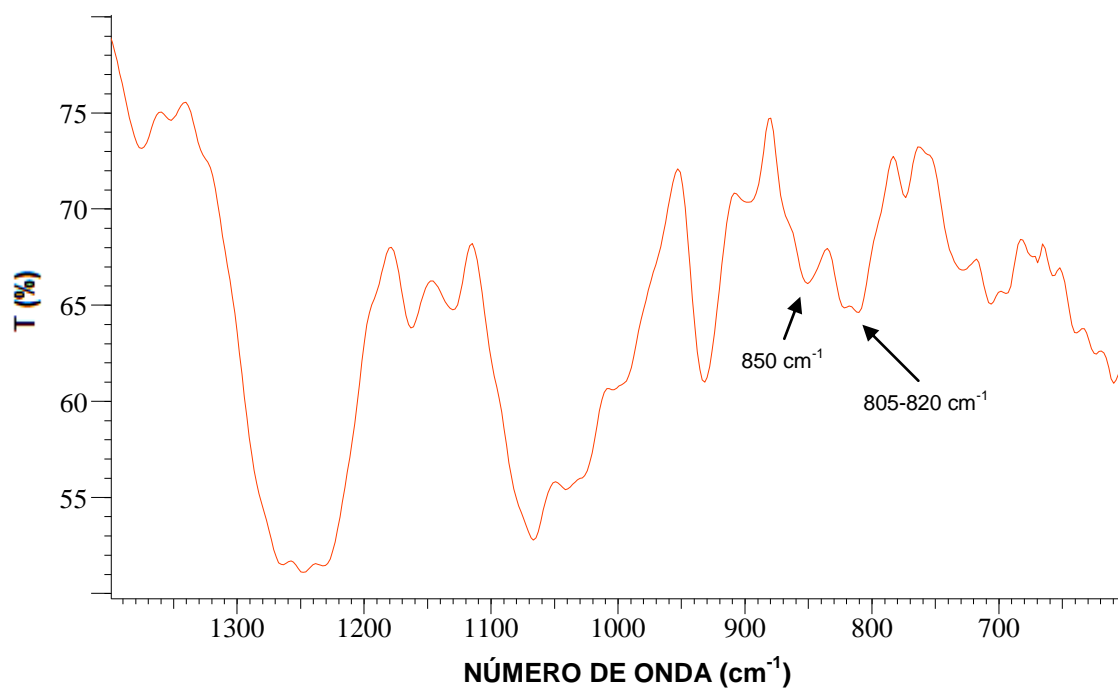


Os dados em conjunto permitem afirmar que a fração K-01OS é composta pelas díades G2S,4S,6S-DA2S e G4S,6S-DA2S, já produzidas por Tành *et al.* (2001), a partir de *iota*-carragenana. Na tabela 4 são encontrados todos os assinalamentos de ^1H e ^{13}C da díade principal da fração K-01OS.

A integração dos sinais anoméricos por RMN ^1H permitiu estimar a proporção das díades no polímero (Tabela 5). O grau de sulfatação (DODGSON; PRICE, 1962) da fração K-01OS foi determinado em 3,8, condizente com o esperado para um polímero com a maioria das díades tetra sulfatadas.

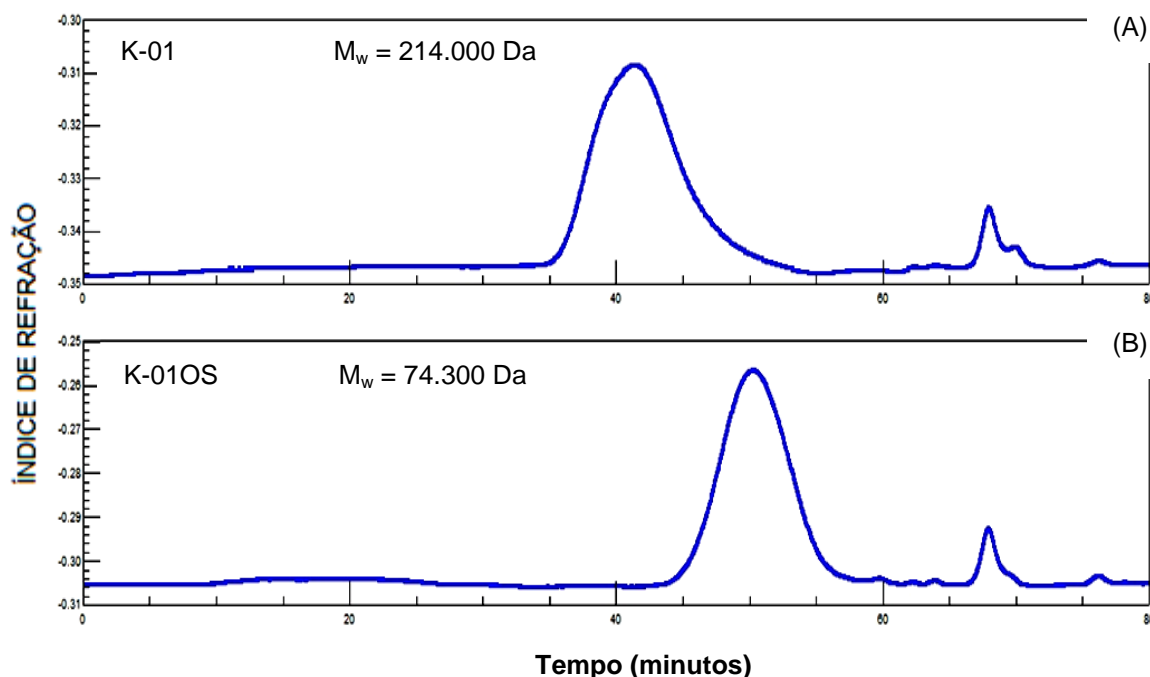
A análise de K-01OS por espectroscopia de infravermelho (Figura 25), mostra bandas de absorção em 705 cm^{-1} (sulfato em C4), 850 cm^{-1} (C4-O-S) e entre $805\text{--}820\text{ cm}^{-1}$ (C2 e C6-O-S), corroborando com os resultados obtidos por espectroscopia de RMN (PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

FIGURA 25 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO K-010S
Região entre 1400 e 600 cm^{-1}



O perfil de eluição, determinado por HPSEC acoplado a índice de refração, indica que houve diminuição na cadeia polissacarídica, confirmado pela determinação da massa molecular. A perda de massa foi causada, provavelmente, pelo rompimento das ligações glicosídicas mais lábeis quando em contato com o complexo de enxofre, de caráter ácido. O cromatograma da fração K-010S mostra o aumento no tempo de retenção quando comparado com o da fração K-01 (Figura 26).

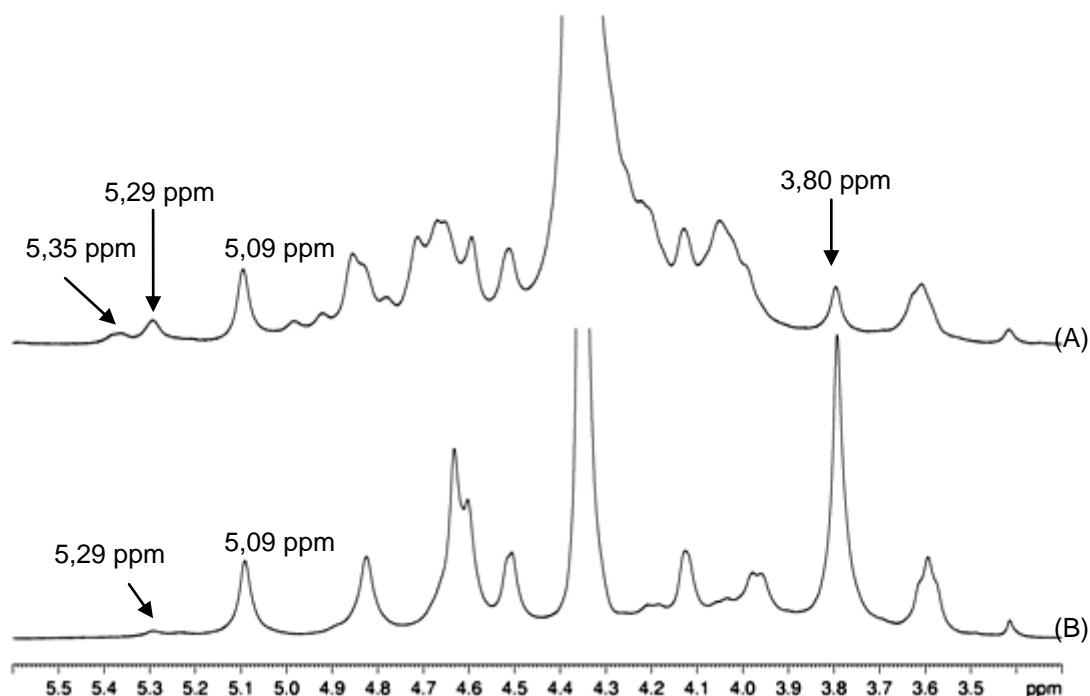
FIGURA 26 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES K-01 (A) E K-01OS (B)



Dando sequência às análises dos produtos de sulfatação, o espectro de ^1H do produto obtido na reação preparativa da sulfatação seletiva em C6 (Figura 27, 3), mostra a diminuição significativa do sinal em 3.80 ppm (H5 e H6 de G4S), quando comparado com o mesmo sinal da amostra inicial K-01 (Figura 27, 1), indicando a sulfatação em C6, confirmada, no espectro de ^{13}C e ^{13}C DEPT (Figura 28, A e B), pelo deslocamento do sinal de C6 de 63.5 para 70.1 ppm e do sinal de C5 de 77.0 para 74.5 ppm. Os sinais de ^{13}C são idênticos aos reportados por Liao *et al.* (1996) para a díade G4S,6S-DA. Dessa forma, através da análise de HSQC esta díade foi completamente caracterizada, conforme assinalamentos na tabela 4. No espectro de ^1H aparece, na região anomérica, um sinal de pequena intensidade em 5.29 ppm, correspondente a H1 de DA2S, enquanto que no espectro de ^{13}C o sinal de C1 em DA2S é observado em 94.0 ppm. Estes resultados indicam a sulfatação em C2 de DA. O sinal em 5.35 ppm no espectro de ^1H corresponde a H1 de DA2S ligado a G2S,4S,6S, conforme foi observado no espectro da fração K-01OS. Pode-se

verificar também um sinal remanescente na região de 3.80 ppm indicando que o C6 não foi totalmente sulfatado. Dessa forma, utilizando a análise de RMN ^1H e HSQC, identificou-se e quantificou-se a presença de outras díades na fração K-016S (Tabela 5).

FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO K-016S (A) OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DE K-01 (B)
Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm para ^1H - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008)



O grau de sulfatação (DODGSON; PRICE, 1962) da fração K-016S foi determinado em 2,1, condizente com o esperado para um polímero com a maioria das díades dissulfatadas.

A análise de K-016S por espectroscopia de infravermelho (Figura 29), mostrou uma banda de absorção na região entre $810\text{-}820\text{ cm}^{-1}$ que podem ser relativas a grupos sulfato em C6 (PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003), corroborando com os resultados obtidos por espectroscopia de RMN.

FIGURA 28 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DEPT (A) E ^{13}C (B) DE K-016S OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DE K-01 (C)

Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008)

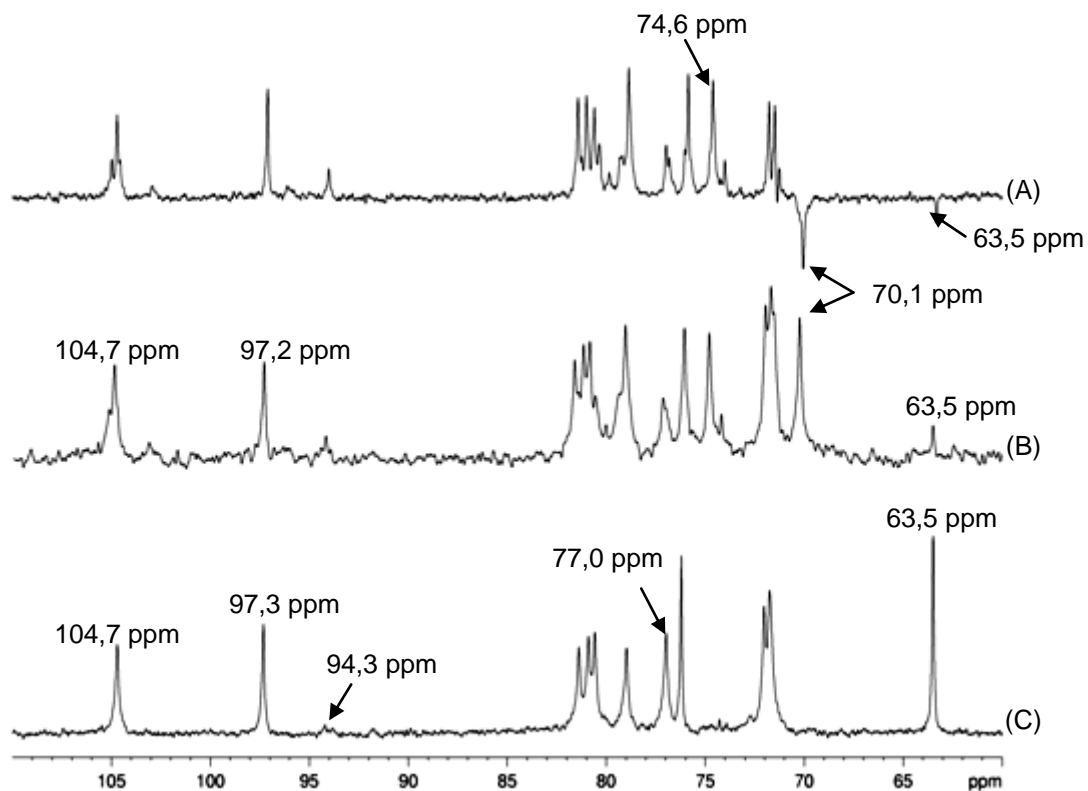


FIGURA 29 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO K-016S
Região entre 1400 e 600 cm^{-1}

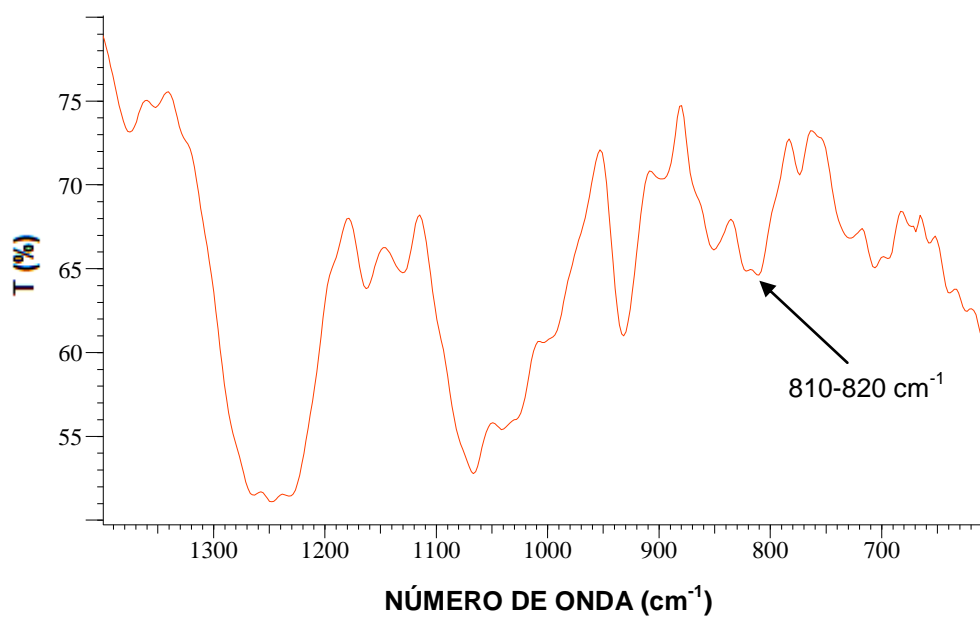


TABELA 4 - ASSINALAMENTOS DE RMN ^1H E ^{13}C DA PRINCIPAL DÍADE PRESENTE NAS FRAÇÕES K-01OS, K-016S, K-01E E K-01ES, OBTIDOS ATRAVÉS DE HSQC

FRAÇÃO ^a	UNIDADE ^b	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) ^c					
		C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6; H6'
K-01OS	G2S,4S,6S	102,84, 83	79,0 4,37	76,7 4,15	75,7 4,98	74,5 4,05	70,0 4,26; 4,26
	DA2S	96,0 5,35	75,8 4,69	79,8 4,85	80,9 4,66	79,3 4,73	71,6 4,12; 4,22
K-016S	G4S,6S	104,74, 65	71,5 3,60	80,6 3,99	75,9 4,84	74,6 4,02	70,1 4,21; 4,26
	DA	97,2 5,09	71,8 4,11	81,4 4,51	81,0 4,64	78,9 4,71	71,3 4,05; 4,05
K-01E	G4S,6piv	104,54, 62	71,5 3,60	80,7 3,95	75,9 4,82	74,3 3,99	66,1 4,30; 4,30
	DA2S	97,1 5,09	71,9 4,10	81,3 4,50	80,7 4,56	78,7 4,63	71,5 4,04; 4,17
K-01ES	G2S,4S	101,74, 77	78,9 4,36	76,9 4,12	75,7 4,97	76,6 3,82	63,3 3,82; 3,82
	DA2S	95,8 5,34	nd ^d nd ^d	79,1 4,87	nd ^d nd ^d	nd ^d nd ^d	71,8 4,12; 4,26

^a Frações obtidas através de modificações químicas em K-01. K-01OS = persulfatação; K-016S = sulfatação seletiva em C6; K-01E = esterificação com cloridrato de pivaloila em C6; K-01ES = persulfatação em C2 de K-01E; ^b os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al.* (1994); ^c referentes ao padrão interno acetona (2,208 e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente), calibrado com DSS – δ = 0,00 ppm, Van de Velde e Rollema (2008); ^d nd = não determinado

O perfil de eluição (Figura 30), determinado por HPSEC acoplado a um detector de índice de refração, indica que houve diminuição na cadeia polissacarídica, assim como na fração K-01OS, evidenciada no cromatograma pelo aumento no tempo de eluição da fração K-016S quando comparada com a fração K-01 e confirmada através determinação da massa molecular.

FIGURA 30 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC (ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES K-01 (A) E K-016S (B)

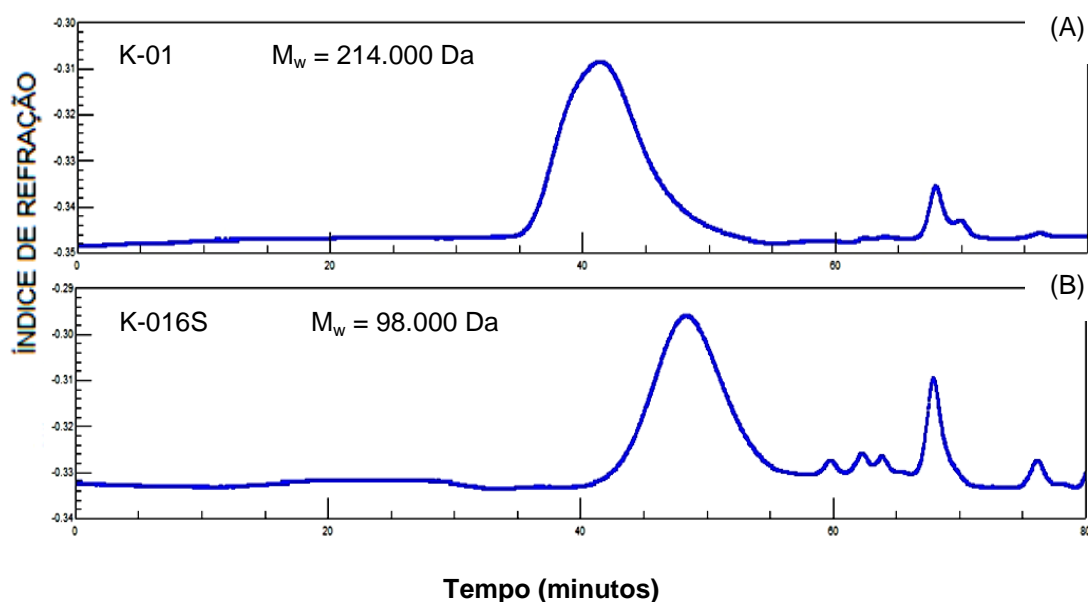


TABELA 5 - ESTIMATIVA DAS DÍADES PRESENTES NAS FRAÇÕES K-01OS E K-016S, GRAU DE SULFATAÇÃO (DS) E MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M_w)

FRAÇÃO	DÍADES ^a	(%) ^b	DS ^c	M_w (Da)
K-01OS	G2S,4S,6S-DA2S	81	3.8	74.300
	G4S,6S-DA2S	19		
K-016S	G4S,6S-DA	55	2.1	98.000
	G4S-DA	17		
	G4S,6S-DA2S/G4S-DA2S	18		
	G2S,4S,6S-DA2S/G2S,4S-DA2S	10		

^a Os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994); ^b estimada a partir RMN ^1H , através da integração dos prótons α -anoméricos de cada díade; ^c metodologia descrita por Dodgson e Price, (1964)

6.4.3 OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DA FRAÇÃO K-01 PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01E

A obtenção do derivado sulfatado em C2 de G4S e DA2S foi dividida em duas etapas: esterificação da hidroxila livre ligada ao carbono 6 da unidade G4S, através da introdução de um grupo protetor (cloridrato de pivaloíla) e sulfatação das hidroxilas livres ligadas aos carbonos 2 de cada unidade da díade.

Primeiramente, com o intuito de sulfatar a fração K-01 seletivamente nas hidroxilas ligadas a C2 de G4S e DA para a formação da díade G2S,4S-DA2S (Figura 20, 5), foi necessária a proteção da hidroxila de C6 e formação de um intermediário contendo a díade G4S,6Piva-DA (Figura 20, 4). Para a formação deste intermediário, a fração K-01 foi submetida a uma reação de esterificação seletiva com o grupo protetor cloridrato de pivaloíla. Várias condições foram testadas (Tabela 6) e o monitoramento das reações foi feito através da integração dos sinais em 3,80, 3,60 e 5,09 ppm, estabelecendo uma relação entre os sinais 3,80/5,09 (3:1) e 3,60/5,09 (1:1), conforme procedimento descrito para as reações de sulfatação.

TABELA 6 - OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DA FRAÇÃO K-01 PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01E

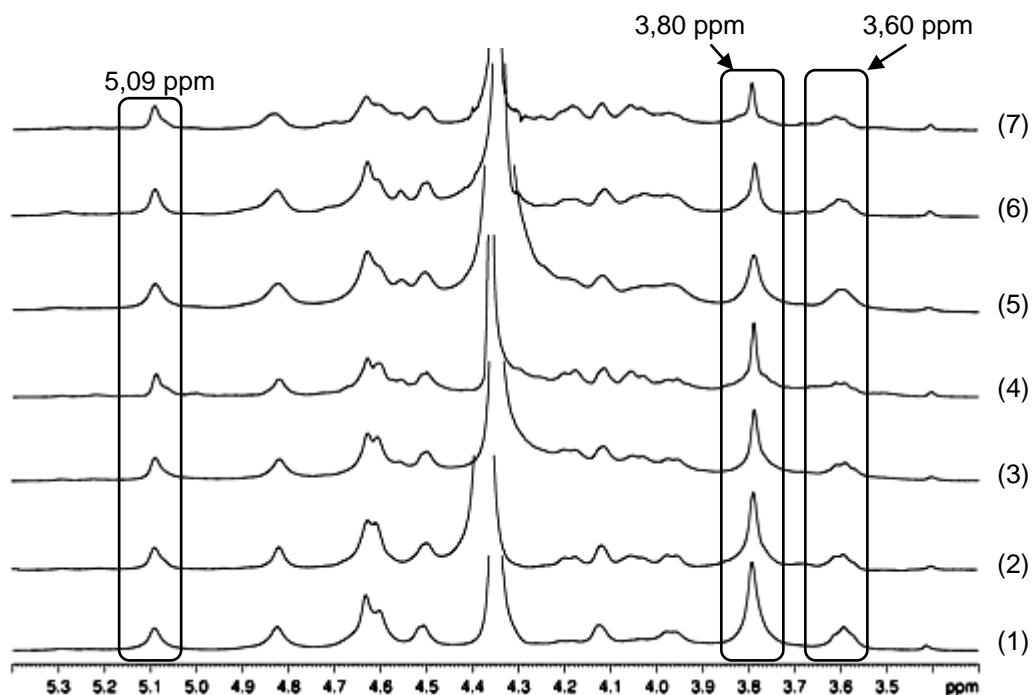
Entrada	Pivaloíla (mL)	T (°C)	t (h)	4-DMAP (g)	Piridina (mL)	Relação 3,60/5,09 ^a	Relação 3,80/5,09 ^a
1 ^b	-	-	-	-	-	1,2	3,5
2 ^b	0,037	20	17	0,01	-	1,2	3,5
3 ^b	0,72	20	17	0,01	-	1,2	3,2
4 ^b	0,72	35	17	0,01	-	1,2	3,4
5 ^b	0,72	35	17	0,01	0,8	1,1	2,0
6 ^{b,c}	0,8 (x3)	20	17	1,2	1,6	1,0	1,8
7 ^d	0,8 (x3)	20	1	0,01	1,6	0,9	1,8

^a Intensidade relativa ao sinal em 5,09 ppm. Integrações foram realizadas através de análises de ¹H RMN; ^b Polímero K-01, na forma sódica; ^c Na entrada 6 foi acrescentado 1% de SDS (lauril sulfato de sódio); ^d polímero na forma de sal de trietilamônio. Em todas as reações foi utilizado o solvente DMFa

No primeiro protocolo de esterificação (Tabela 6, entrada 2) a amostra K-01 foi solubilizada em DMF anidro e tratada com o cloridrato de pivaloíla (trimetil acetil cloridrato) durante 17h, na presença do catalisador 4-amino dimetil piridina. A análise por RMN ^1H mostrou que não houve esterificação em C6, pois não há evidência da diminuição do sinal em 3,80 ppm (Figura 31, 2). No protocolo seguinte, (Tabela 6, entrada 3) a quantidade de cloridrato de pivaloíla foi aumentada cerca de 20 vezes, mas praticamente não houve variação no sinal em 3,80 ppm. O aumento da temperatura para 35°C (Tabela 6, entrada 4) também não representou melhora na esterificação de C6. Nesse estágio, foi adicionada a piridina (Tabela 6, entrada 5), com o intuito de acentuar a reatividade das hidroxilas na reação de esterificação. Foi observada uma redução na relação 3,80/5,09 de 3,5 para 2,0 evidenciando a esterificação em C6. O sinal de 3,60 ppm (C2 de G4S) não diminuiu significativamente, indicando que a esterificação foi principalmente regioseletiva em C6. Na tentativa de aumentar a esterificação, foi realizada uma reação com maior quantidade de pivaloíla, catalisador e piridina (Tabela 6, entrada 6), além da inclusão do lauril sulfato de sódio (SDS) nessa condição de reação. A análise por RMN ^1H mostrou que houve diminuição do sinal em 3,80 ppm (Figura 31, espectro 6). A relação 3,80/5,09 diminuiu de 3,5 para 1,8 indicando melhora na condição de esterificação. Houve também diminuição na relação 3,60/5,09 sugerindo a entrada do éster de pivaloíla em C2 de G4S em menor grau que em C6. Como última tentativa de aumentar a sulfatação seletiva em C6, foi realizada uma reação utilizando o polímero na forma de sal de trietilamônio (Tabela 6, entrada 7). A análise por RMN ^1H (Figura 31, espectro 7) revelou que a esterificação em C6 foi semelhante a da condição anterior, mas que em C2 de G4S aumentou significativamente, evidenciada pela diminuição na relação 3,60/5,09 de 1,2 para 0,9. Esse resultado indica que a utilização do polímero na forma de sal de trietilamônio de fato promove o aumento na reatividade das hidroxilas, como aconteceu na reação de persulfatação (K-01OS).

FIGURA 31 - ESPECTROS DE RMN ^1H DA OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM K-01

Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm para ^1H - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008). A numeração da figura corresponde às entradas da tabela 6



Dessa forma, de todos os protocolos testados, a melhor condição encontrada para a esterificação seletiva em C6 de G4S foi a da entrada 6, que apresenta melhor seletividade em C6, com menor esterificação em C2.

6.4.4 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01E PREPARATIVA, UTILIZANDO A MELHOR CONDIÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM C6

Escolhida a melhor condição de esterificação, a fração K-01 foi submetida a uma reação preparativa com o objetivo de obter a fração K-01E em quantidade suficiente para a caracterização por RMN e a realização da sulfatação seletiva em C2 de G4S e DA. O espectro de ^1H foi semelhante ao da amostra analítica (Figura 31, espectro 6). No espectro de ^{13}C (Figura 32), verifica-se a presença de um sinal

em 28,8 ppm correspondente as metilas do grupamento pivaloíla. Este carbono apresentou correlação no espectro de HSQC (Figura 33) com prótons que aparecem em 1,20 ppm. Através dos sinais desses prótons foi possível assinalar, no espectro de HMBC (Figura 34), o carbono quaternário e a carboxila do grupamento pivaloíla em 41,0 e 183,5 ppm, respectivamente. Esses dados confirmam a esterificação de K-01 com o grupo protetor. Ainda no espectro de ^{13}C , a principal diferença entre o espectro do polímero nativo e o da amostra esterificada foi o deslocamento do sinal de C6 de G4S de 63,5 para 66,1 ppm e do sinal de C5 de 77,0 para 74,3 ppm. Os assinalamentos obtidos através da análise por HSQC encontram-se na tabela 4. Dessa forma, através da análise dos espectros, foi possível caracterizar a díade G4S,6piv-DA. Os dados em conjunto sugerem que a fração K-01E é formada por polímeros constituídos pela díade repetitiva G4S,6Piv-DA, mas também pela díade G4S-DA (K-01). A integração do sinal em 3,80 ppm no espectro de próton de K-01E comparada com a de K-01, permitiu estimar a quantidade da díade esterificada em 44%.

FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO K-01E OBTIDA A PARTIR DA ESTERIFICAÇÃO SELETIVA EM C6 DE K-01

Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde e Rollema (2008)

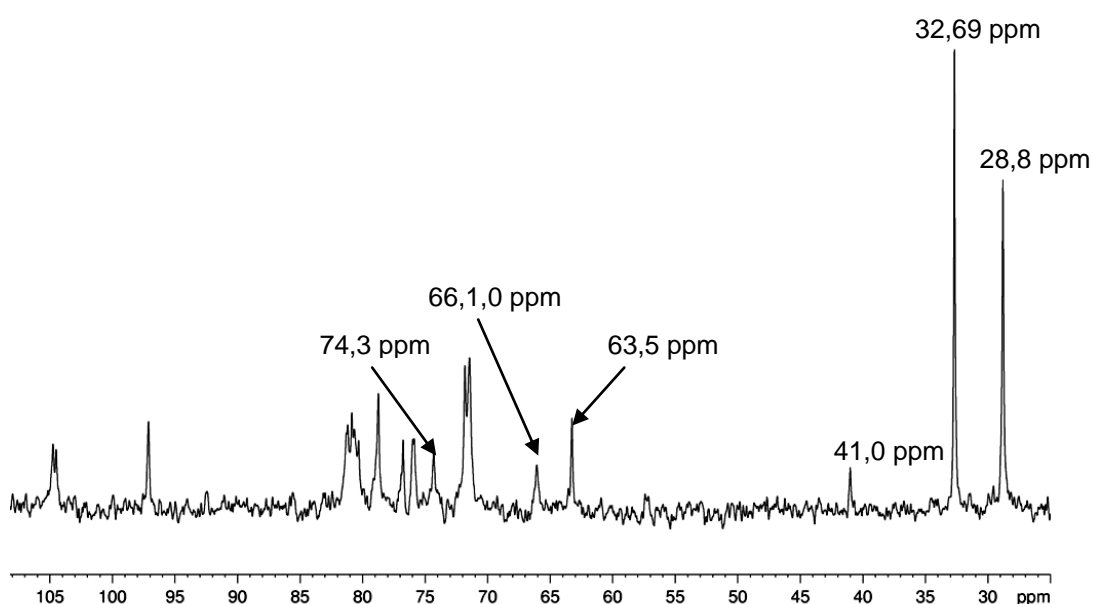


FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO K-01E

Solvente: D₂O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C , respectivamente - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde e Rollema (2008)

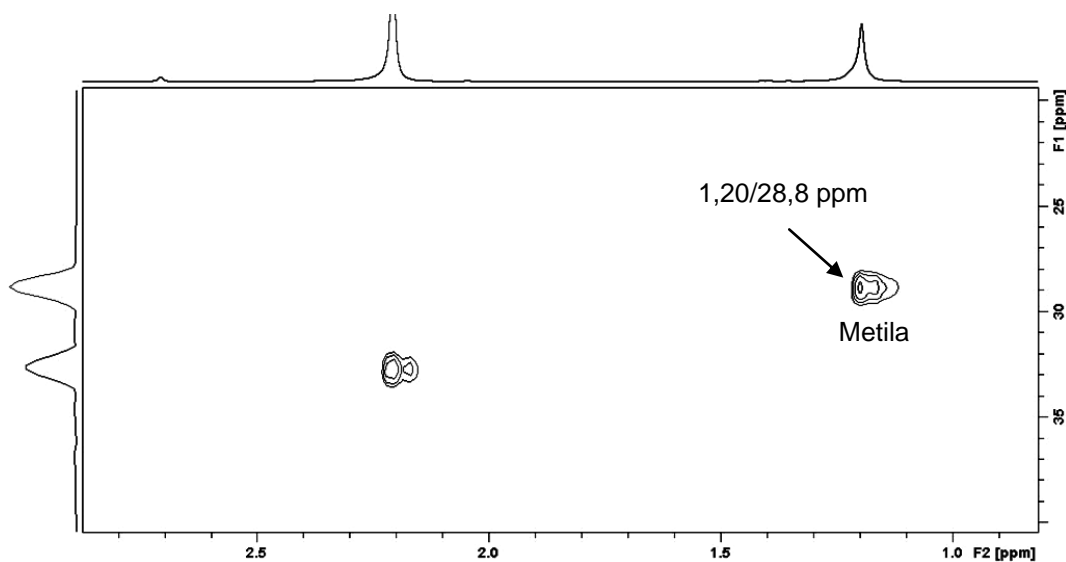
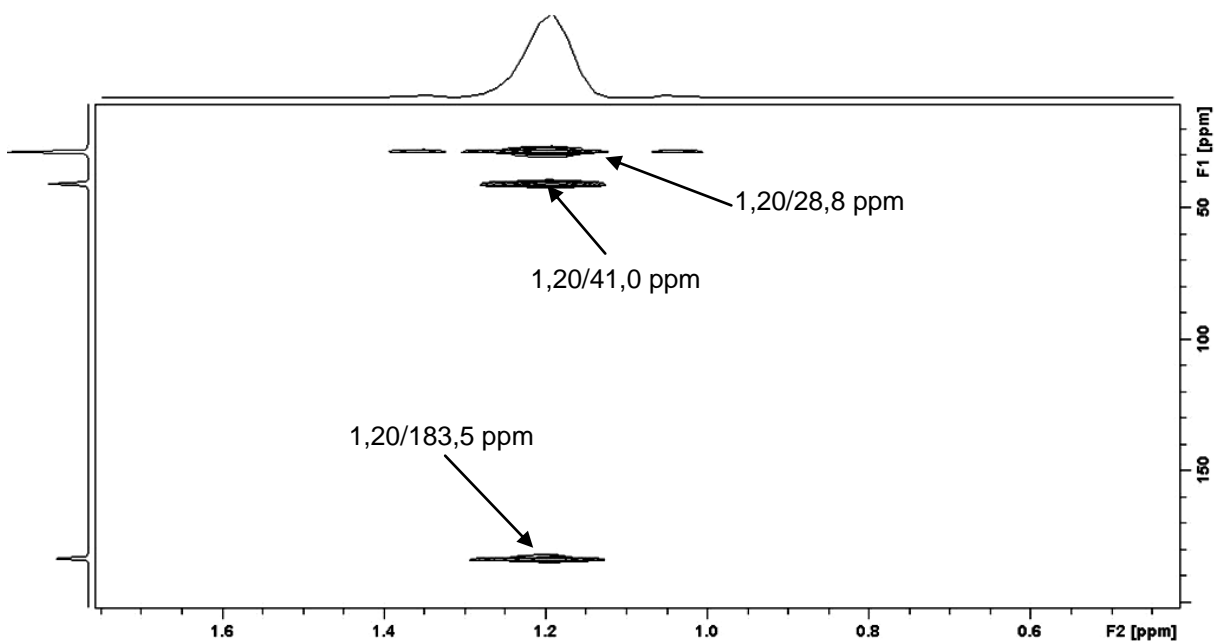


FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN HMBC DE K-01E

Solvente: D₂O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C , respectivamente - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008)

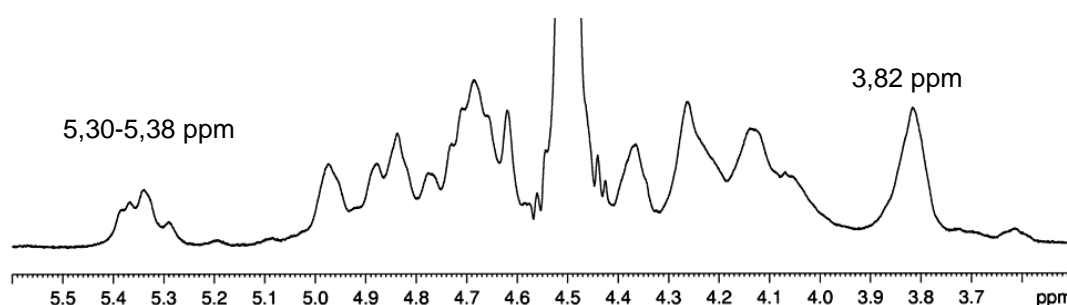


6.4.5 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K-01ES A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA EM C2 (UNIDADES G4S E DA) DA FRAÇÃO K-01E

A segunda etapa da obtenção do derivado sulfatado em C2 de G4S e DA2S (Figura 20, 5) consistiu na sulfatação da fração K-01E que contém a díade G4S,6piv-DA. Para isso, a fração K-01E foi solubilizada em DMF anidro e submetida à sulfatação com o complexo trióxido de enxofre-piridina ($\text{SO}_3\text{-Py}$). Acrescentou-se 2M2B como acceptor de prótons e deixou-se reagir por um período de 17h. Após a sulfatação, a amostra foi tratada com hidróxido de sódio, com o intuito de promover a desproteção em C6 de G4S6Piv, uma vez que a ligação éster é lábil em meio alcalino. A análise por RMN ^1H (Figura 35) mostra um sinal em 3,82 ppm, assinalado como sendo correspondente a H6 e H5 de G2S,4S. Na região anomérica verifica-se a presença de sinais na região de 5,30 a 5,38 ppm, correspondentes a H1 de DA2S.

FIGURA 35 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO K-01ES OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE C2 (UNIDADES G4S E DA) DA FRAÇÃO K-01E

Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm para ^1H - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008)



No espectro de ^{13}C (Figura 36), o sinal em 95,8 e 96,1 ppm indicam a presença das unidades DA2S. Os dados em conjunto mostram a presença da díade G2S,4S-DA2S, a qual foi caracterizada no produto formado, indicando que a condição de proteção, sulfatação seletiva e desproteção foi executada com êxito. Através da análise por HSQC e utilizando os dados das frações caracterizadas

anteriormente, foi possível fazer os assinalamentos dessa díade (Tabela 4). O espectro de ^1H mostra um sinal de baixa intensidade em 3,60 ppm, correspondente a H2 das unidades de β -D-galactopiranosose, indicando que a fração K-01E pode não ter sido sulfatada completamente ou no momento da esterificação houve proteção com pivaloíla nesta posição. Esse dado sugere a presença das díades G4S-DA2S e G4S,6S-DA2S na fração K-01ES, confirmado também pelo sinal em 5,30 ppm, correspondente a H1 de DA2S dessas díades. Ainda na região anomérica, verifica-se um sinal em 5,35 ppm correspondente a H1 de DA2S da díade G2S,4S,6S-DA2S, formada a partir da persulfatação da díade G4S-DA presente na fração K-01E. Os sinais anoméricos em 102,9 e 96,1 ppm no espectro de ^{13}C confirmam essa informação, uma vez que essa díade já foi caracterizada na fração K-01OS. A integração dos sinais anoméricos no espectro de HSQC permitiu estimar a proporção das díades no polímero (Tabela 7).

O perfil de eluição, obtido por HPSEC acoplado a índice de refração, indica que houve diminuição na cadeia polissacarídica, evidenciada no cromatograma pelo aumento no tempo de eluição da fração K-01ES e pela determinação da massa molecular (Figura 37). Embora seja possível a degradação durante a etapa de esterificação ou remoção do grupo pivaloíla em meio alcalino, o mais provável é que a perda de massa molecular tenha ocorrido durante a etapa de sulfatação, conforme observado para outras frações.

FIGURA 36 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO K-01ES OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE K-01E

Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde e Rollema (2008)

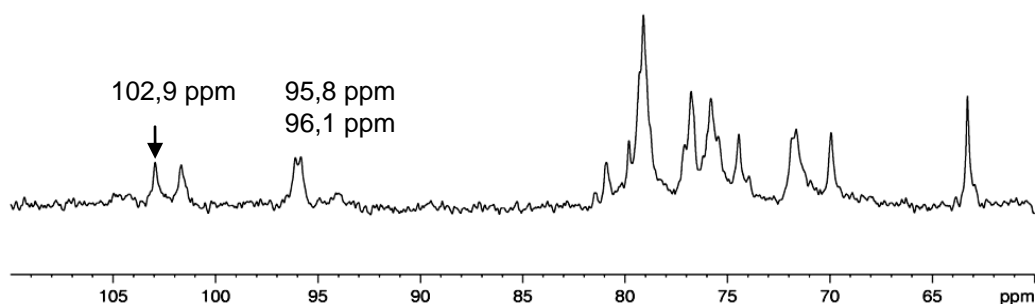


FIGURA 37 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC (ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES K-01 (A) E K-01ES (B)

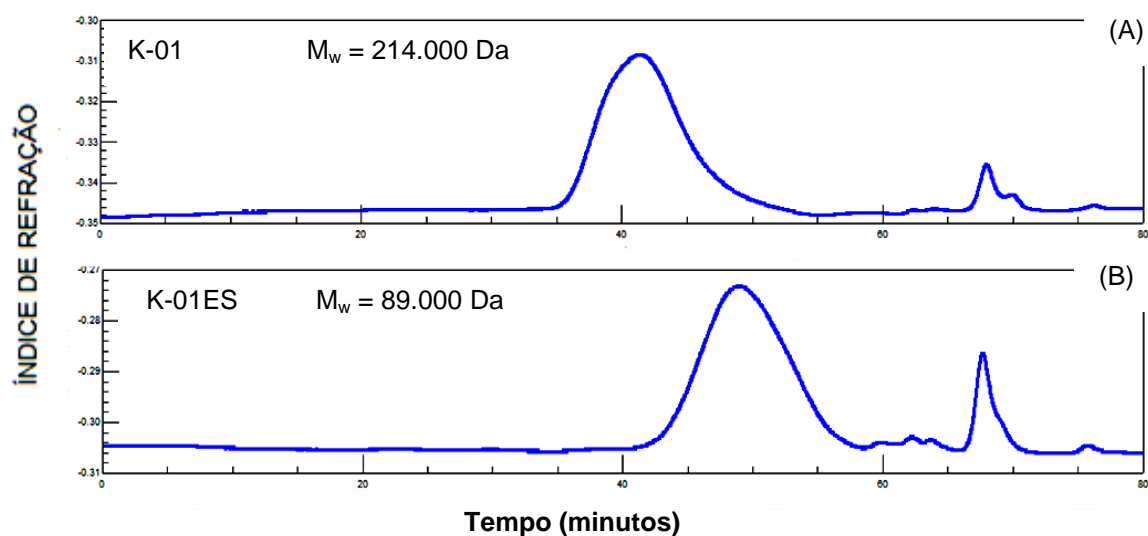


TABELA 7 - ESTIMATIVA DAS DÍADES PRESENTES NA FRAÇÃO K-01ES, GRAU DE SULFATAÇÃO (DS) E MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M_w)

FRAÇÃO	DÍADES ^a	(%) ^b	DS ^c	M_w (Da)
K-01ES	G2S,4S-DA2S	40	3,2	89.000
	G4S-DA2S/G4S,6S-DA2S	06		
	G2S,4S,6S-DA2S	54		

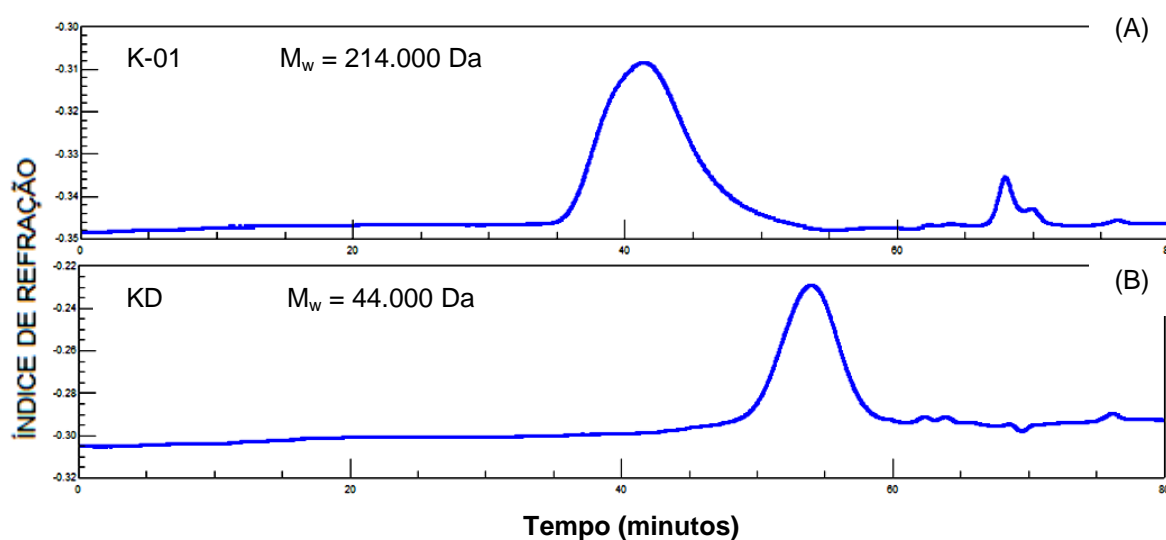
^a Os códigos de letras referem-se a nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994); ^b estimada a partir da integração por RMN ^1H dos prótons anoméricos de cada díade; ^c metodologia descrita por Dodgson e Price (1964)

6.4.6 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO KD ATRAVÉS DA DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA FRAÇÃO K-01

A fração K-01 foi submetida a um processo de dessulfatação de acordo com a metodologia de solvólise de Nagasawa; Inoue e Kamata (1977). A fração polissacarídica foi inicialmente transformada em sal de piridônio, depois foi solubilizada na mistura reativa (DMSO, metanol e piridina) e mantida a 100°C por

4h. Por ser executado em alta temperatura, o processo de solvólise pode levar ao rompimento de ligações mais lábeis, como aquelas envolvendo unidades anidrogalactosídicas e promover degradação no polissacarídeo. O cromatograma obtido através de cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) mostra que de fato ocorreu diminuição na massa molecular, evidenciado pelo aumento no tempo de retenção da fração KD quando comparado com a fração K-01 (Figura 38).

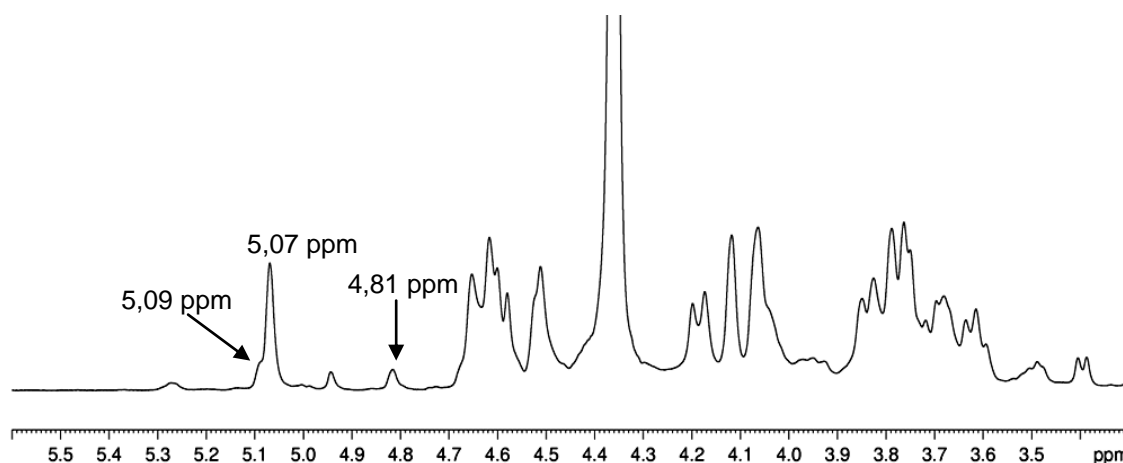
FIGURA 38 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC (ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES K-01 (A) E KD (B)



A fração KD foi analisada por RMN. O espectro de ^1H (Figura 39) mostra um sinal na região anomérica em 5,07 ppm característico de H1 da unidade DA de *beta*-carragenana (KOLENDER; MATULEWICZ, 2004), sobreposto a um sinal de menor intensidade em 5,09 ppm (H1 de DA) da *kappa*-carragenana (fração K-01), indicando a dessulfatação parcial dessa fração. A sobreposição dos sinais anoméricos impediu a quantificação das díades presentes na fração através da integração das áreas desses sinais. Portanto, uma alternativa encontrada para a quantificação foi considerar a área dos sinais anoméricos sobrepostos como 100% e

integrá-la com o sinal de H4 de G4S que aparece em 4,81 ppm, referido por Usov (1984) e confirmado nas análises de HSQC das frações K-016S e K-01OS (Tabela 4). O resultado da integração dos sinais anoméricos sobrepostos subtraído do valor da área integrada de H4 de G4S, mostrou que a díade G-DA corresponde a 78% da fração, sendo 22% correspondente a díade G4S-DA.

FIGURA 39 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO KD OBTIDA ATRAVÉS DE DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA FRAÇÃO K-01
Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm para ^1H - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008)



O espectro de ^{13}C da fração KD comparado com o da fração K-01 (Figura 40) mostra o deslocamento do sinal de C4 de G4S de 76,3 para 68,6 ppm, como o obtido por Van de Velde e Rollema (2008) para a *beta*-carragenana.

O espectro de infravermelho (Figura 41) mostra a diminuição significativa da banda em absorção em 850 cm^{-1} característica de C4-O-S, indicando a dessulfatação parcial da fração K-01 (TOJO; PRADO, 2003), corroborando com os resultados obtidos por RMN. O grau de sulfatação da amostra KD foi determinado em 0,14, esperado para uma amostra 78% dessulfatada (Tabela 8).

FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO KD (A) COMPARADA COM A FRAÇÃO K-01 (B)

Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm). O sinal em 76,3 ppm refere-se ao C4 de *kappa*-carragenana (K-01) sulfatado e em 68,6 ppm ao C4 de *beta*-carragenana (KD) sem sulfato (VAN DE VELDE; ROLLEMA, 2008)

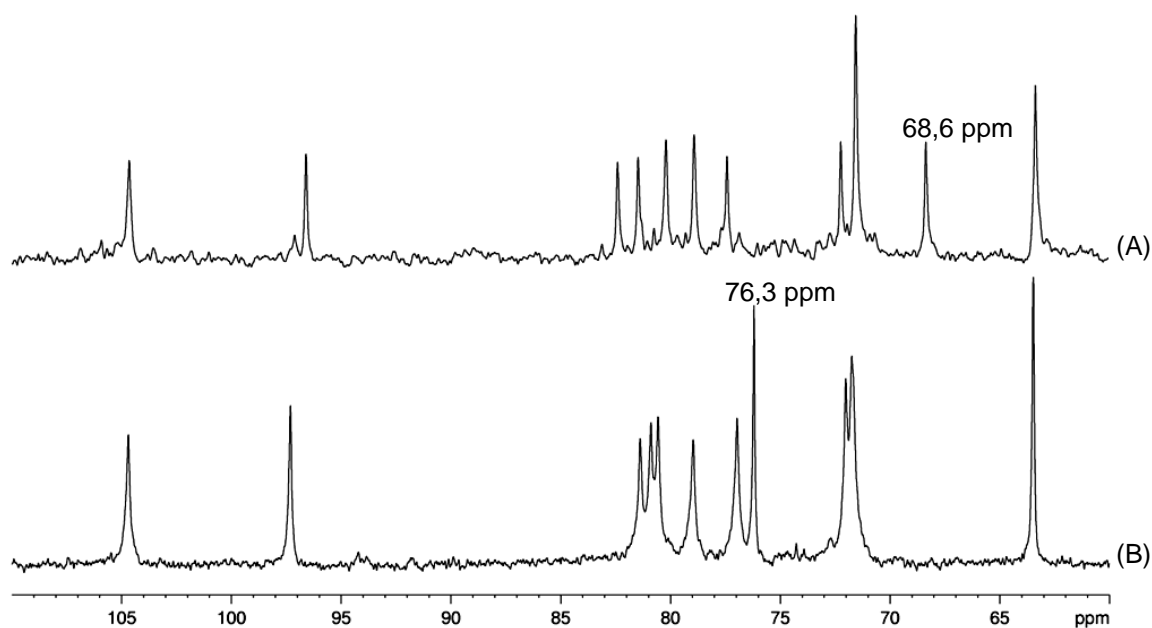
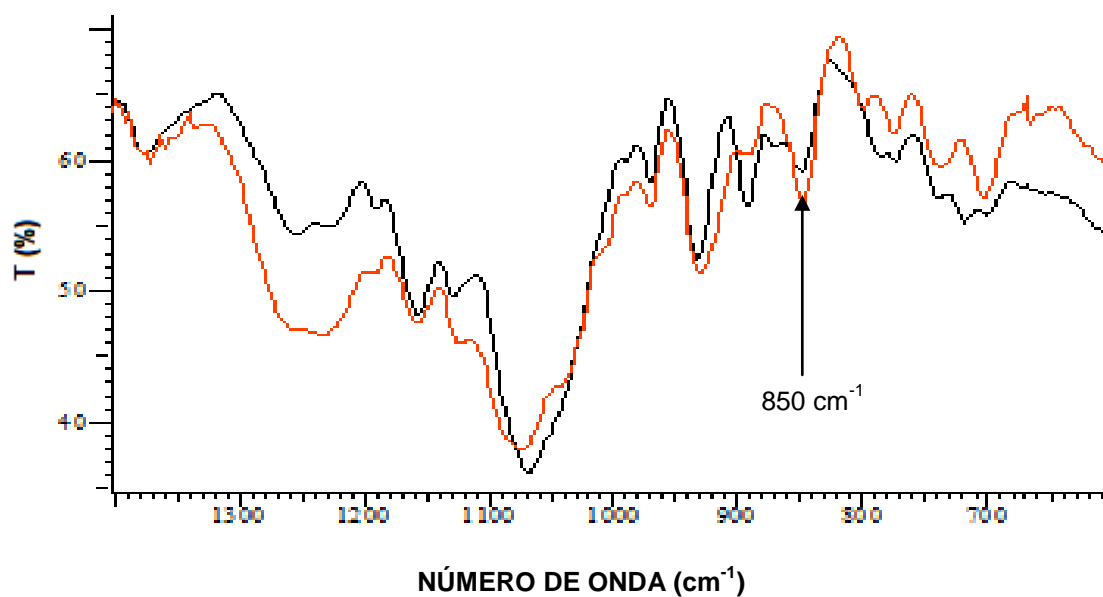


FIGURA 41 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO KD (EM PRETO) COMPARADO COM A FRAÇÃO K-01 (EM VERMELHO)
Região entre 1400 e 600 cm^{-1}



6.4.7 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO KD-6S ATRAVÉS DA SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO KD

A fração KD constituída principalmente pela díade G-DA (Figura 20, 6) foi submetida à sulfatação seletiva de C6 da unidade G para produzir uma fração contendo a díade G6S-DA (Figura 20, 7).

Para a sulfatação seletiva em C6, foi estabelecido um protocolo semelhante ao executado na reação de sulfatação seletiva em C6 da fração K-01. A amostra foi solubilizada em DMFa e submetida às condições de reação por 1h, utilizando-se $\text{SO}_3\text{-Py}$ como agente sulfatante.

O produto formado (KD-6S) foi caracterizado por RMN. O espectro de ^1H (Figura 42, A) mostra a diminuição significativa no sinal entre 3,74-3,79 ppm (H5 e H6 de G), quando comparado com o mesmo sinal da amostra inicial KD (Figura 42, B), indicando a sulfatação em C6, confirmada, no espectro de ^{13}C (Figura 43, A), pelo deslocamento do sinal de C6-G de 63,5 (VAN DE VELDE; ROLLEMA, 2008) para 69,2 ppm. O sinal de C6 sulfatado (69,2 ppm) aparece invertido em DEPT 135 (Figura 43, B). A análise dos dados permite sugerir que a fração KD-6S é formada por polímeros constituídos majoritariamente pela díade repetitiva G6S-DA, mas também pela díade G-DA (KD). Não foi possível a integração dos sinais por RMN ^1H devido à sobreposição dos sinais anoméricos em 5,07 e 5,09 ppm. O perfil de eluição obtido por HPSEC acoplado a índice de refração (Figura 44, B) mostra que houve diminuição da cadeia polissacarídica, quando comparado com o perfil de eluição da fração KD (Figura 44, A).

FIGURA 42 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO KD-6S (A) OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO KD (B)

Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm para ^1H - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008)

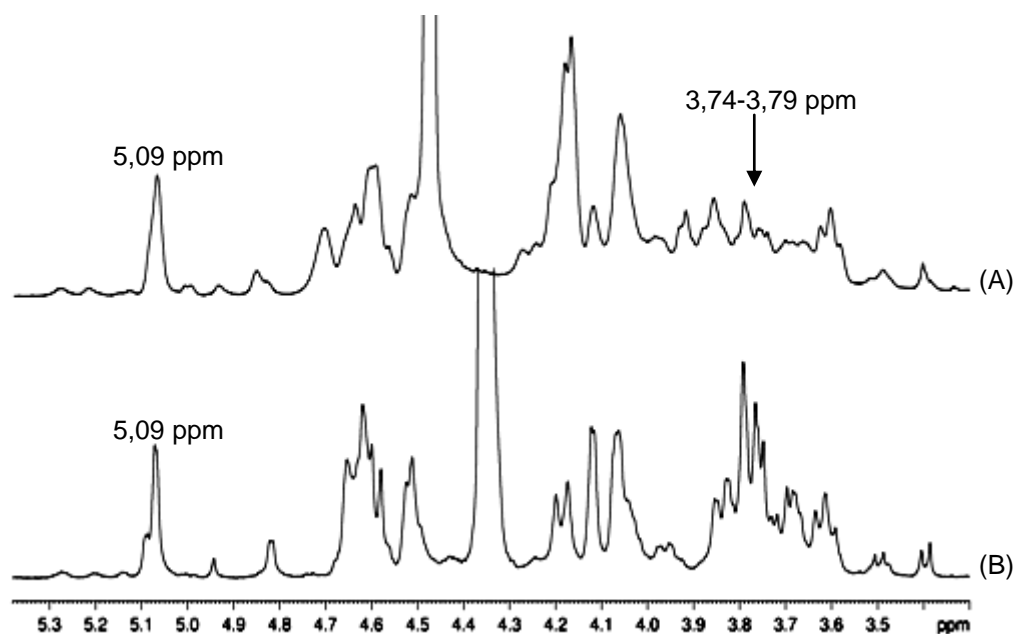


FIGURA 43 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DEPT (A) E ^{13}C (B) DA FRAÇÃO KD-6S OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE C6 DA FRAÇÃO KD (A)

Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde e Rollema (2008)

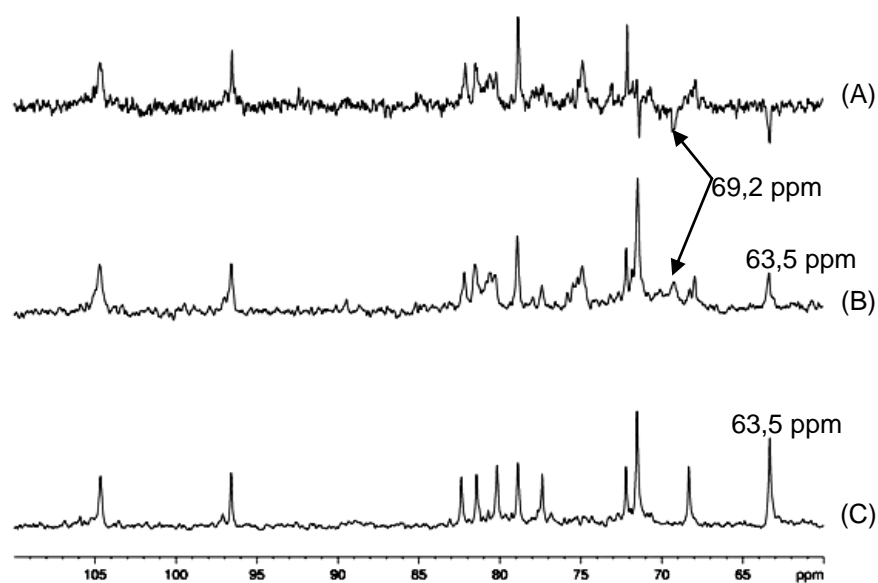


FIGURA 44 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC (ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES KD (A) E KD-6S (B)

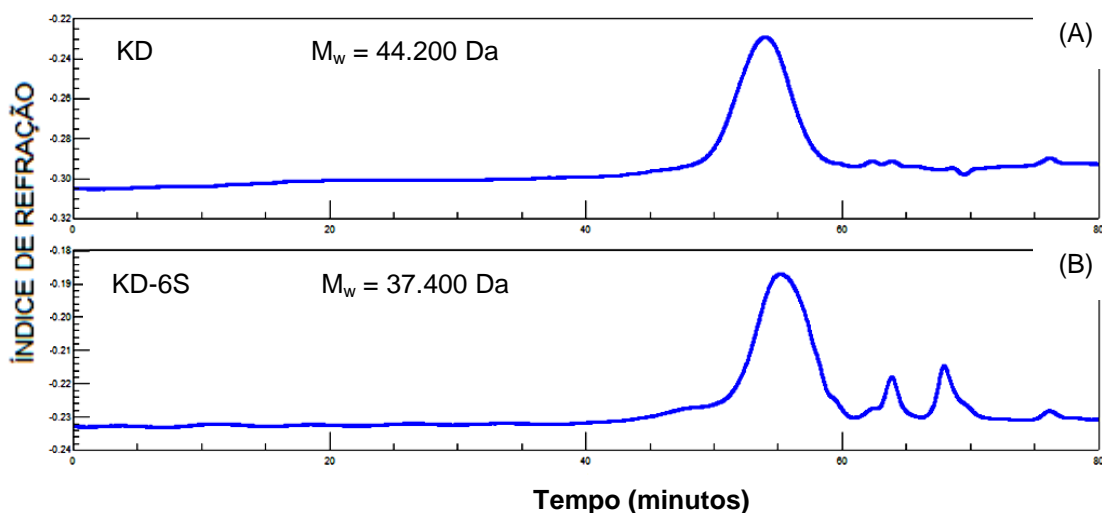


TABELA 8 - ESTIMATIVA DAS DÍADES PRESENTES NAS FRAÇÕES KD E KD-6S, GRAU DE SULFATAÇÃO (DS) E MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M_w)

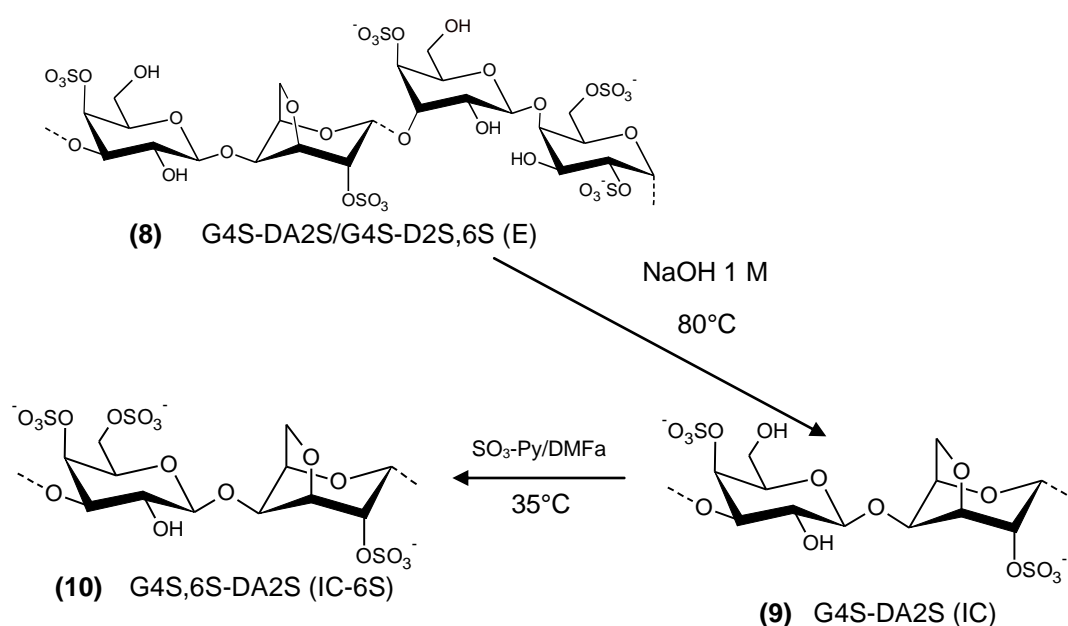
FRAÇÃO	DÍADES ^a	(%) ^b	DS ^c	M_w (Da)
KD	G4S-DA	22	0,14	44.200
	G-DA	78		
KD-6S	G6S-DA	nd ^d	0,58	37.400

^a Os códigos de letras referem-se a nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994); ^b estimada a partir da integração por RMN ¹H dos prótons anoméricos de cada díade; ^c metodologia descrita por Dodgson e Price (1964); ^d não determinado

6.5 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM *IOTA*-CARRAGENANA (IC)

A fração E, constituída por *iota/nu*-carragenana (Figura 45, 8), foi submetida a tratamento alcalino (item 6.2) para a obtenção da fração IC que contém *iota*-carragenana, G4S-DA2S (Figura 45, 9). Esta fração foi submetida à sulfatação seletiva em C6 para produzir a díade G4S,6S-DA2S (Figura 45, 10). Inicialmente, visando encontrar a melhor condição de sulfatação seletiva, varias reações analíticas foram realizadas. Assim como na sulfatação seletiva de K-01, a entrada do grupamento sulfato na posição C6 de G4S foi monitorada através da espectroscopia por RMN ^1H . Foi realizada a integração dos sinais em 5,29, 3,80 e 3,60 ppm, que correspondem respectivamente a H1 de DA2S e H6/H5 e H2 da unidade G4S (USOV, 1984).

FIGURA 45 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DA FRAÇÃO IC (*IOTA*-CARRAGENANA) ATRAVÉS DE TRATAMENTO ALCALINO DA FRAÇÃO E. SULFATAÇÃO SELETIVA DE C6 DA FRAÇÃO IC PARA OBTENÇÃO DE SEU DERIVADO QUIMICAMENTE MODIFICADO IC-6S



6.5.1 OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO IC PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO IC-6S

No primeiro protocolo de reação (Tabela 9, entrada 2) foi utilizado o complexo trióxido de enxofre-piridina ($\text{SO}_3\text{-Py}$) como agente sulfatante e o 2M2B como acceptor de prótons. O tempo de reação foi de 3h, com a coleta de duas frações (após 1 e 3h – entradas 2 e 3 respectivamente).

O produto formado foi analisado por RMN ^1H . O espectro da amostra evidencia a diminuição do sinal em 3,80 ppm, indicando a sulfatação em C6 (Figura 46, espectros 2 e 3). A integração dos sinais em 3,80 ppm (Tabela 9, entradas 2 e 3) indica que não houve diferença na sulfatação das frações coletadas em 1 e 3h.

TABELA 9 - OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO IC PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO IC-6S

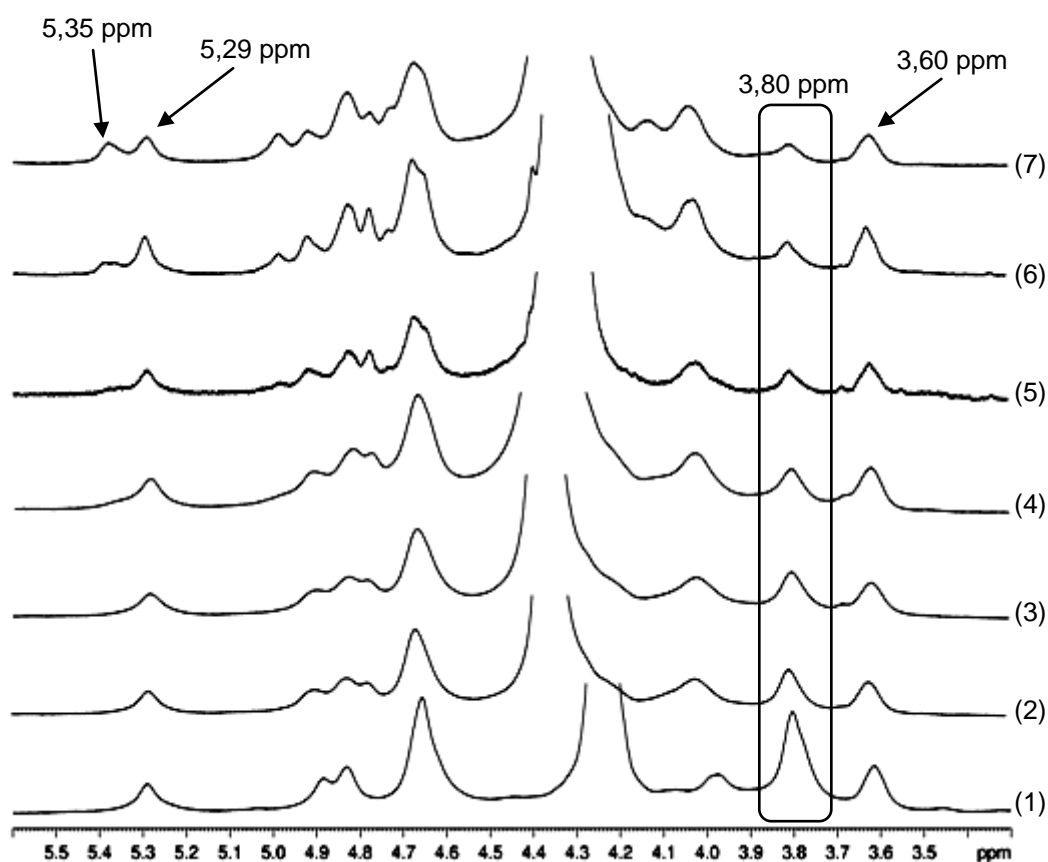
Entrada ^a	$\text{SO}_3\text{-Py}^b$ (mg)	T(°C)	t(h)	Relação 3,62/5,29 ^c	Relação 3,80/5,29 ^c	Relação 5,35/5,29 ^c
1	-	-	-	1,4	3,3	-
2	500	20	1	1,4	1,9	-
3	500	20	3	1,4	1,9	-
4	730	20	6	1,3	1,3	-
5	730	35	1	1,3	1,0	0,2
6	730	35	3	1,1	0,8	0,4
7	730	35	8	1,0	0,8	0,7

^a Fração IC na forma de sal sódico. ^b $\text{SO}_3\text{-Py}$ = complexo trióxido de enxofre-piridina; ^c intensidade relativa ao sinal em 5,29 ppm. Integrações foram realizadas através de análises de RMN ^1H . Em todas as reações utilizou-se 50 mg do polissacarídeo. Em todas as condições o pH foi mantido em 7,0 com a adição de trietilamina

Com o intuito de melhorar a condição de sulfatação anterior, foi elaborado um segundo protocolo (Tabela 9, entrada 4). Nessa condição, a concentração do agente sulfatante foi aumentada e o tempo de reação foi de 6h. O espectro de RMN ^1H (Figura 46, espectro 4) mostra que houve baixo grau de sulfatação seletiva em C6, conforme indicado pela redução da relação 3,80/5,29 de 1,9 para 1,3. No terceiro protocolo (Tabela 9, entradas 5, 6 e 7) houve aumento da temperatura, sendo a

reação realizada em 8h com a coleta de amostras em 1, 3 e 8h. O espectro de RMN ^1H mostra que após 1h de reação houve diminuição do sinal em 3,80 ppm, significando aumento da sulfatação nessa condição (Figura 46, espectro 5) quando comparada com a anterior. Em 3 e 8h de reação (Figura 46, espectros 6 e 7, respectivamente) o sinal em 3,80 ppm diminuiu em relação a amostra coletada em 1h, entretanto, evidencia-se uma diminuição no sinal em 3,60 e o aumento no sinal em 5,35 ppm, indicando a formação da díade G2S,4S,6S-DA2S devido a sulfatação em C2 de G4S.

FIGURA 46 - ESPECTROS DE RMN ^1H DOS PRODUTOS OBTIDOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE REAÇÃO PARA A OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO IC
Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm para ^1H - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008). A numeração da figura corresponde as entradas da tabela 9

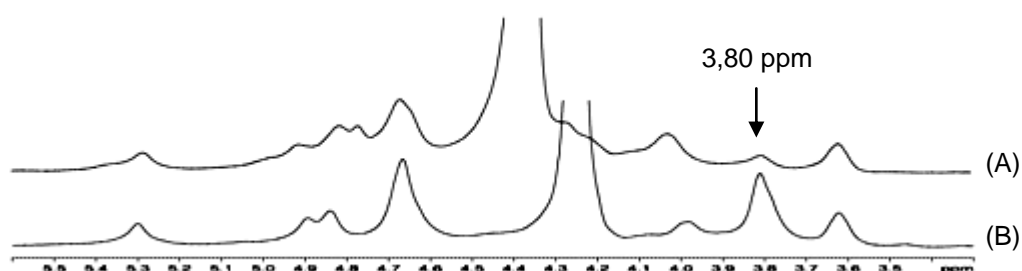


Portanto, a condição de sulfatação seletiva 5 foi a que proporcionou a formação majoritária da díade G4S,6S-DA2S com menor quantidade da díade G2S,4S,6S-DA2S.

Depois de estabelecida a melhor condição de sulfatação, a fração K-01 (200 mg) foi submetida a uma reação preparativa com o objetivo de obter a fração IC-6S em quantidade suficiente para os ensaios de caracterização e atividade biológica.

O produto formado na reação preparativa (IC-6S) foi caracterizado por RMN. O espectro de ^1H (Figura 47, A) mostra a diminuição do sinal em 3,80 ppm (H5 e H6 de G4S), quando comparado com o mesmo sinal da amostra inicial IC (Figura 47, B), indicando sulfatação nessa posição.

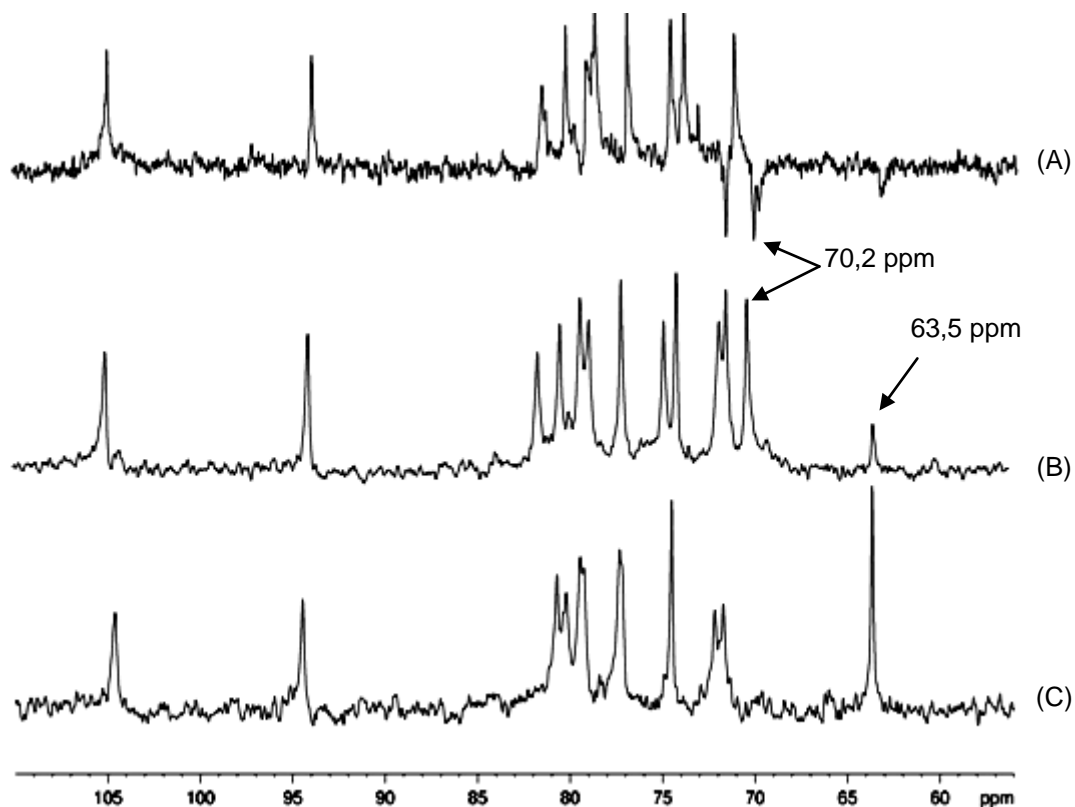
FIGURA 47 - ESPECTROS DE RMN ^1H DA FRAÇÃO IC-6S (B) OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE C6 DA FRAÇÃO IC (A)
Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm para ^1H - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde; Rollema (2008)



No espectro de ^{13}C (Figura 48, B), a sulfatação em C6 é evidenciada pelo deslocamento do sinal de 63,5 (C6 livre) para 70,2 ppm (TÂN *et al*, 2001). No espectro de ^{13}C DEPT (Figura 48, A), o sinal de 70,2 ppm invertido confirma a presença de C6 sulfatado. Na análise por RMN HSQC (Figura 49) verifica-se uma correlação entre 3,80/63,5, referente à H6/C6 de G4S, indicando que a sulfatação em C6 não foi completa, o que sugere a presença da díade inicial G4S-DA2S na fração IC-6S. Na região anomérica encontra-se a correlação 4,68/105,1 (H1/C1 de G4S ou G4S,6S). Esse dado indica que não houve sulfatação em C2 de G4S, uma vez que não se observa sinais de carbono anomérico em campo mais alto. Os assinalamentos obtidos através da análise por HSQC encontram-se na tabela 11.

FIGURA 48 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DEPT (A) E ^{13}C (B) DA FRAÇÃO IC-6S OBTIDA A PARTIR DA SULFATAÇÃO SELETIVA DE C6 DA FRAÇÃO IC (C)

Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde e Rollema (2008)



Através da integração dos sinais anoméricos por RMN ^1H foi possível estimar a proporção das díades no polímero (Tabela 10). O grau de sulfatação (DODGSON; PRICE, 1962) da fração IC-6S foi determinado em 2,4.

FIGURA 49 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO IC-6S

Solvente: D₂O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C , respectivamente - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde e Rollema (2008)

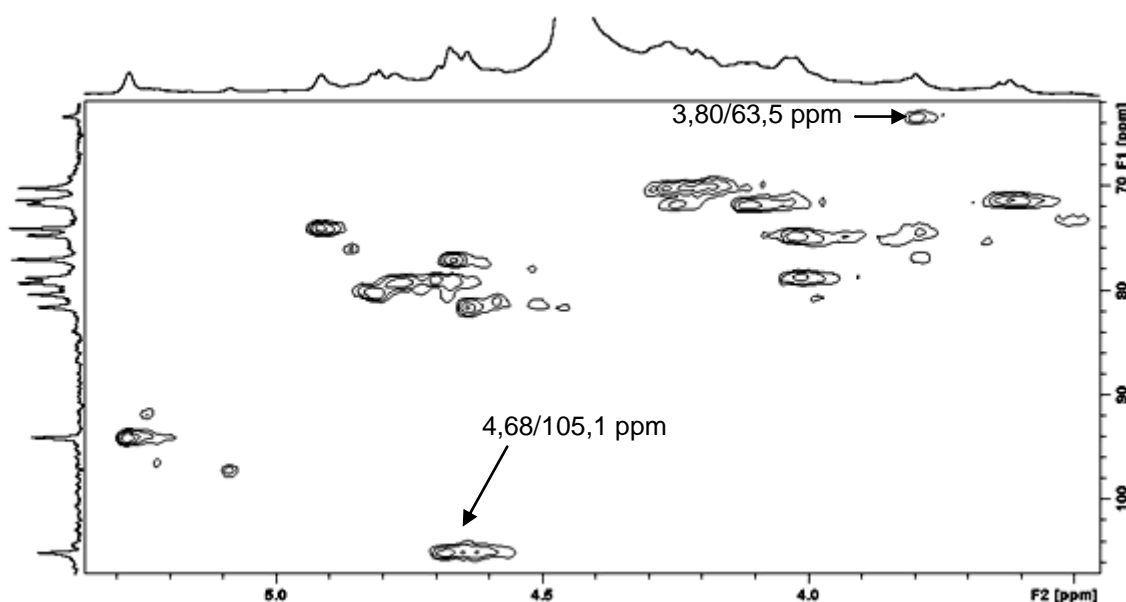


TABELA 10 - ESTIMATIVA DAS DÍADES PRESENTES NA FRAÇÃO IC-6S, GRAU DE SULFATAÇÃO (DS) E MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M_w)

FRAÇÃO	DÍADES ^a	(%) ^b	DS ^c	M_w (Da)
IC-6S	G4S-DA2S	27	2,10	250.000
	G4S,6S-DA2S	73		

^a Os códigos de letras referem-se a nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994); ^b estimada a partir da integração por RMN ^1H dos prótons anoméricos de cada díade; ^c metodologia descrita por Dodgson e Price (1964)

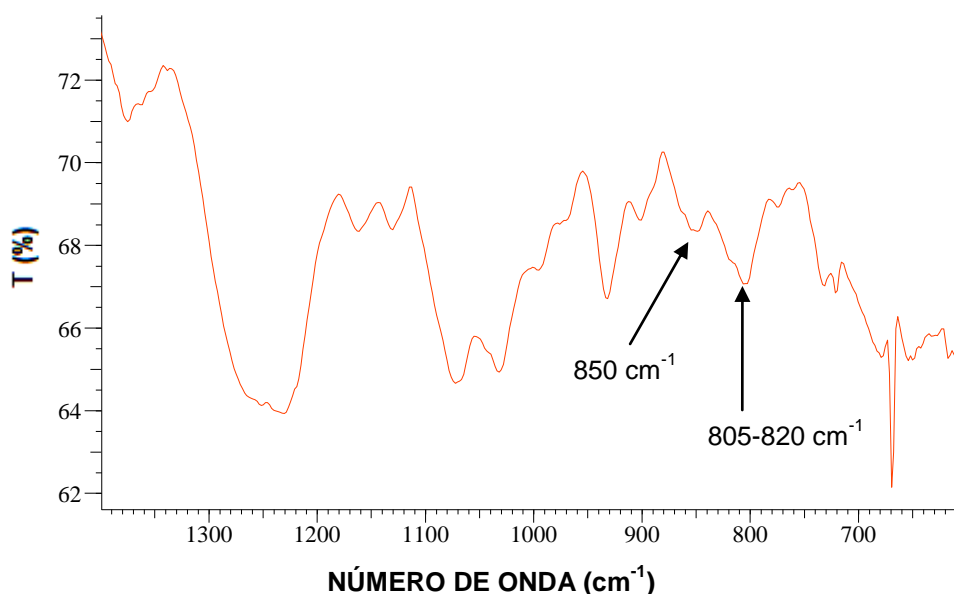
TABELA 11 - ASSINALAMENTOS DE RMN ^1H E ^{13}C DA PRINCIPAL DÍADE PRESENTE NA FRAÇÃO IC-6S, OBTIDOS ATRAVÉS DE HSQC

FRAÇÃO ^a	UNIDADE ^b	DESLOCAMENTOS (ppm) ^c					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6/H6;H6'
IC-6S	G4S,6S	105,0	71,3	78,7	74,0	74,7	70,2
		4,67	3,62	4,03	4,93	4,02	4,26; 4,26
	DA2S	94,0	77,0	80,3	81,3	79,2	71,7
		5,28	4,68	4,83	4,63	4,77	4,11; 4,26

^a Fração obtida através da sulfatação seletiva em C6 da fração IC; ^b os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al.* (1994); ^c referentes ao padrão interno acetona (2,208 e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente), calibrado com DSS – $\delta = 0,00$ ppm, Van de Velde e Rollema (2008)

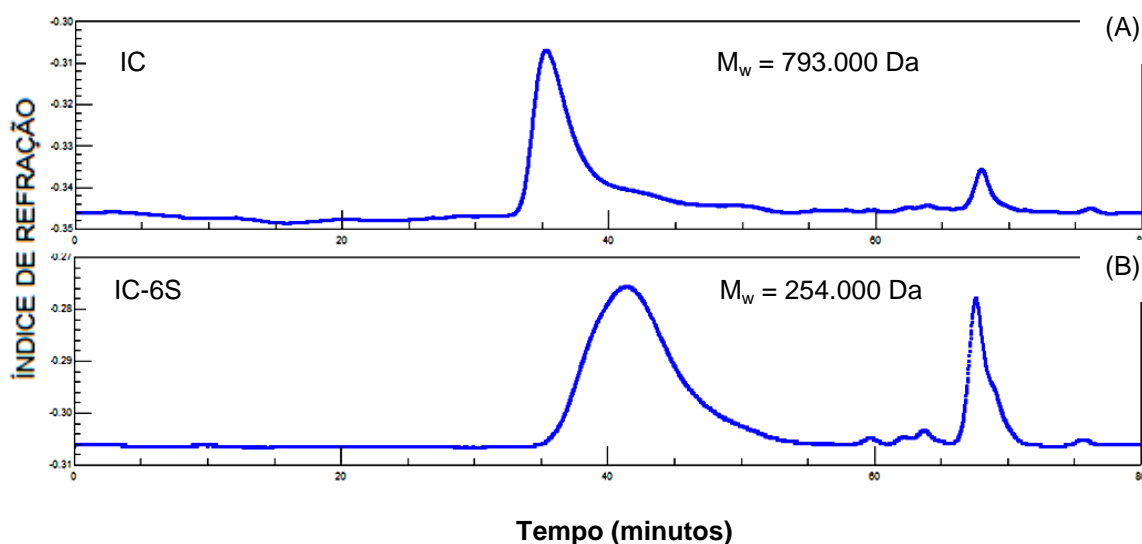
A análise de IC-6S por espectroscopia de infravermelho (Figura 50) mostra bandas de absorção em 805 cm^{-1} (C2-O-S em DA2S), 850 cm^{-1} (C4-O-S em G4S) e um ombro em 820 cm^{-1} (C6-O-S em G4S), corroborando com os resultados obtidos por espectroscopia de RMN (PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

FIGURA 50 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO IC-6S
Região entre 1400 e 600 cm^{-1}



O perfil de eluição, determinado por HPSEC acoplado a índice de refração, indica que houve quebra na cadeia polissacarídica, evidenciada pelo aumento no tempo de retenção da fração IC-6S quando comparada com o da fração IC e com a massa molecular (Figura 51).

FIGURA 51 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC (ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES IC (A) E IC-6S (B)

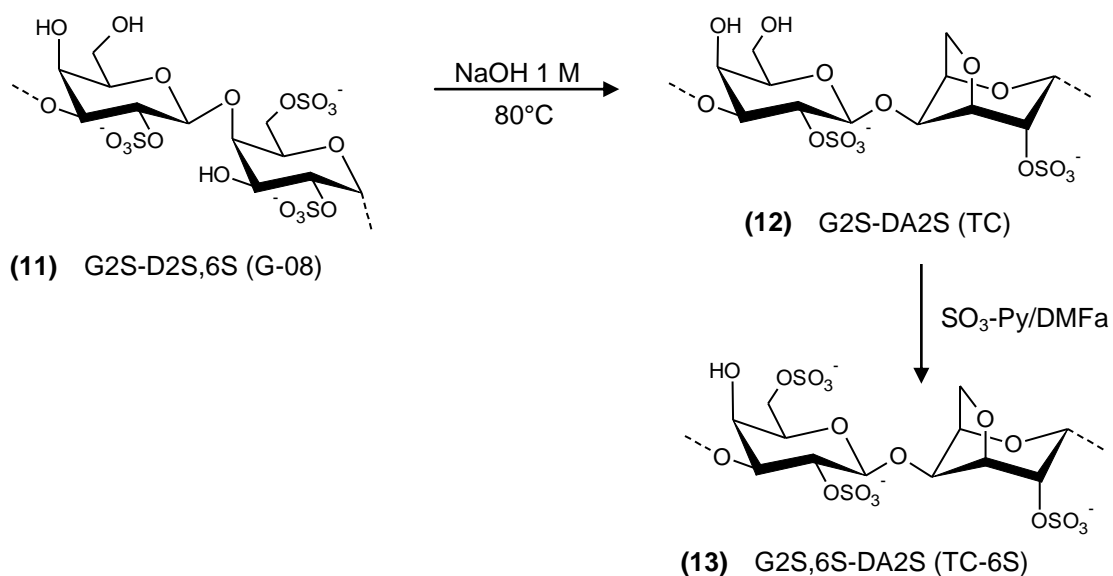


6.6 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM *THETA*-CARRAGENANA (TC)

A fração G-08 (Figura 52, 11) foi submetida a tratamento alcalino para a obtenção da fração TC (Figura 52, 12). A *theta*-carragenana (TC) apresenta uma estrutura dissacarídica repetitiva constituída de unidades de (1→3) β -D-galactopiranosose 2-sulfato (G2S) e (1→4) α -D-3,6-anidrogallactopiranosose 2-sulfato (DA2S), com hidroxilas livres nas posições de C4 e C6 da unidade de G2S. Nessa fração foi realizada uma sulfatação seletiva na hidroxila ligada a C6 de G2S para produzir a díade G2S,6S-DA2S (TC-6S). A entrada do grupamento sulfato na

posição C6 de G2S foi monitorada através da espectroscopia por RMN ^1H , através da integração da área dos sinais na região de 5,28 ppm (H1 de DA2S) e de 3,72-3,77 ppm (H6/H6' e H5 de G2S), estabelecendo uma relação entre os sinais 3,72-3,77/5,28 (1:3). A entrada de um grupamento sulfato em C6 de G2S submete os prótons ligados a esse carbono a um novo ambiente químico, causando o deslocamento dos sinais dessa região.

FIGURA 52 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DA FRAÇÃO TC (*THETA*-CARRAGENANA) ATRAVÉS DO TRATAMENTO ALCALINO DA FRAÇÃO G-08. SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO TC PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO TC-6S



6.6.1 OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE SULFATAÇÃO SELETIVA EM C6 DA FRAÇÃO TC PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO TC-6S

No primeiro protocolo de reação (Tabela 12, entrada 2) foi utilizado o complexo trióxido de enxofre-piridina ($\text{SO}_3\text{-Py}$) como agente sulfatante e o 2M2B como aceptor de prótons. O tempo de reação foi de 1h.

TABELA 12 - OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE SULFATAÇÃO SELETIVA NA FRAÇÃO TC PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO TC-6S

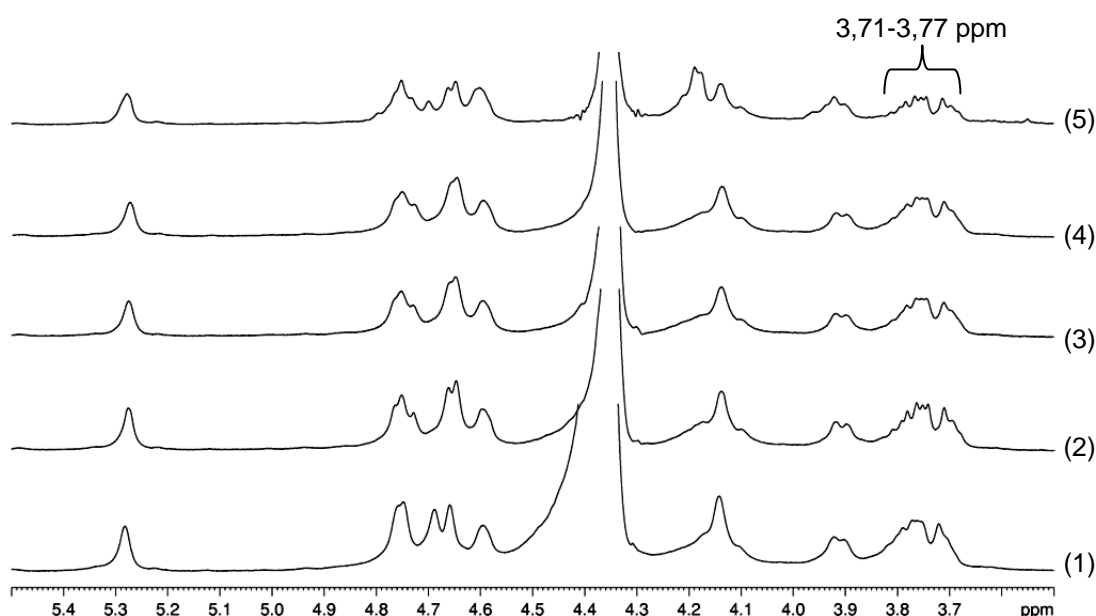
Entrada	Polímero	SO ₃ -Py ^a (mg)	T (°C)	t (h)	Relação 3,77-3,72/5,28 ^b
1	TC ^c	-	-	-	3,3
2	TC ^c	500	20	1	3,4
3	TC ^c	730	35	4	3,4
4	TC ^c	730	35	6	3,4
5	TC-TEA ^d	500	20	1	2,0

^a SO₃-Py = complexo trióxido de enxofre-piridina; ^b intensidade relativa ao sinal em 5,28 ppm. Integrações foram realizadas através de análises de RMN ¹H; ^c fração TC na forma de sal sódico; ^d TC-TEA = fração TC na forma de sal de trietilamônio. Em todas as reações utilizou-se 50 mg do polissacarídeo. Em todas as condições o pH foi mantido em 7,0 com a adição de trietilamina

O produto formado foi analisado por RMN ¹H. A integração dos sinais da região de 3,77- 3,72 ppm foi de 3,3 para 3,4 (Tabela 12, entrada 2) indicando que não houve sulfatação em C6 de G2S (Figura 53, 2).

FIGURA 53 - ESPECTRO DE RMN ¹H DA OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE SULFATAÇÃO SELETIVA DE C6 DA FRAÇÃO TC PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO TC-6S

Solvente: D₂O (60°C); acetona como padrão interno (δ = 2,208 ppm para ¹H - referente ao DSS - δ = 0,0 ppm), Van de Velde; Rollema (2008). A numeração da figura corresponde às entradas da tabela 12

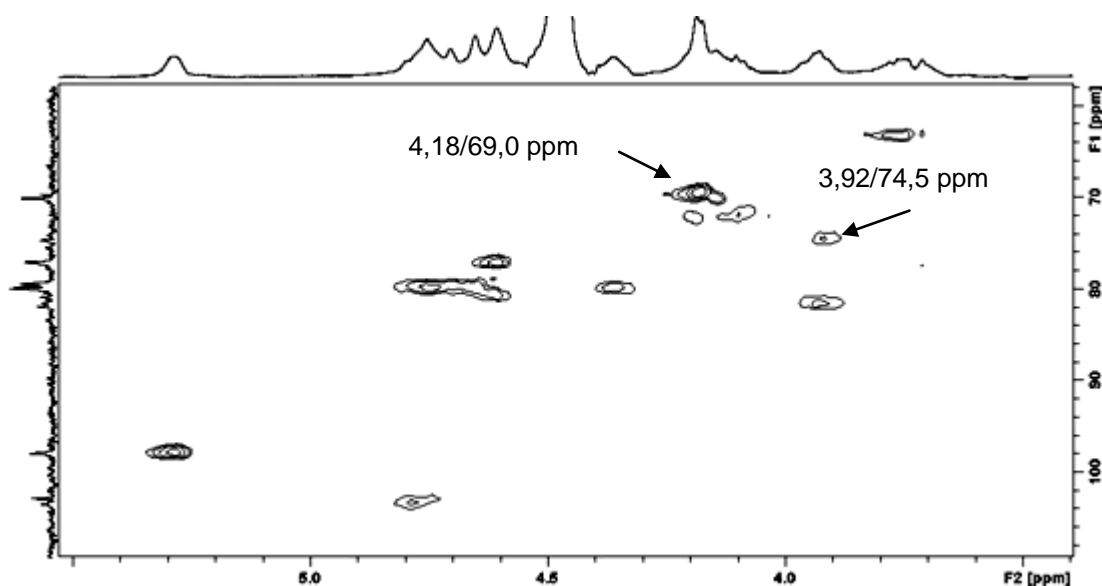


No segundo protocolo (Tabela 12, entradas 3 e 4) a concentração do agente sulfatante e a temperatura foram aumentados, com o intuito de melhorar a condição anterior, mas a relação entre os sinais continuou a mesma (Figura 53, 3 e 4). No último protocolo (Tabela 12, entrada 5), foi utilizado o polímero na forma de sal de trietilamônio com o intuito de melhorar a solubilidade no solvente DMFa e assim aumentar a reatividade do complexo de $\text{SO}_3\text{-Py}$. O espectro de RMN ^1H do produto (Figura 53, 5) mostra uma pequena diminuição na relação 3,72-3,77/5,28 ppm de 3,3 para 2,0, indicando a sulfatação em C6 de G2S. Esta foi a melhor condição de sulfatação entre todas as testadas.

A amostra da entrada 5 (TC-6S) foi caracterizada por RMN. A análise por RMN ^1H mostrou que a relação 3,72-3,77/5,28 ppm diminuiu de 3,3 para 2,0 (Tabela 12, entrada 5), indicando a sulfatação em C6 (Figura 53, 5). No espectro de RMN HSQC (Figura 54) foram observadas as correlações de 3,92/74,5 e 4,18/69,0 referentes à C5/H5 e C6/H6, respectivamente. Com o auxílio do espectro de HSQC e o conhecimento dos deslocamentos da díade G2S-DA2S, a díade G2S,6S-DA2S foi assinalada (Tabela 13).

FIGURA 54 - ESPECTRO DE RMN HSQC DE TC-6S

Solvente: D_2O (60°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C , respectivamente - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm), Van de Velde e Rollema (2008). As correlações entre 3,92/74,5 e 4,18/69,0 correspondem a C5/H5 e C6/H6, respectivamente



Nas frações derivadas da *kappa*- e *iota*-carragenana foram observadas as correlações de H4/C4 de G4S na região de 4,82-4,97/74,0-75,9 ppm. No espectro HSQC da fração TC-6S não existe essa correlação, permitindo afirmar que não houve sulfatação em C4 de G2S. Os dados em conjunto sugerem que a fração TC-6S é formada pelas díades G2S,6S-DA2S e G2S-DA2S. A integração dos sinais por RMN ^1H permitiu estimar a quantidade aproximada de cada díade na fração (Tabela 14), demonstrando um baixo rendimento na sulfatação seletiva em C6.

TABELA 13 - ASSINALAMENTOS DE RMN ^1H E ^{13}C DA PRINCIPAL DÍADE PRESENTE NA FRAÇÃO TC-6S, OBTIDOS ATRAVÉS DE RMN POR HSQC

FRAÇÃO ^a	UNIDADE ^b	DESLOCAMENTOS (ppm) ^c					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6/H6;H6'
TC-6S	G2S,6S	103,2	79,7	81,4	69,4	74,5	69,0
		4,79	4,35	3,91	4,17	3,92	4,18; 4,18
	DA2S	97,7	77,0	nd ^d	nd ^d	nd ^d	71,9
		5,29	4,60	nd ^d	nd ^d	nd ^d	4,18; 4,18

^a Fração obtida através da sulfatação seletiva em C6 da fração TC; ^b os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al.* (1994); ^c referentes ao padrão interno acetona (2,208 e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente, calibrado com DSS – $\delta = 0,00$ ppm), Van de Velde e Rollema (2008); ^d nd = não determinado

TABELA 14 - ESTIMATIVA DAS DÍADES PRESENTES NA FRAÇÃO TC-6S, GRAU DE SULFATAÇÃO (DS) E MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M_w)

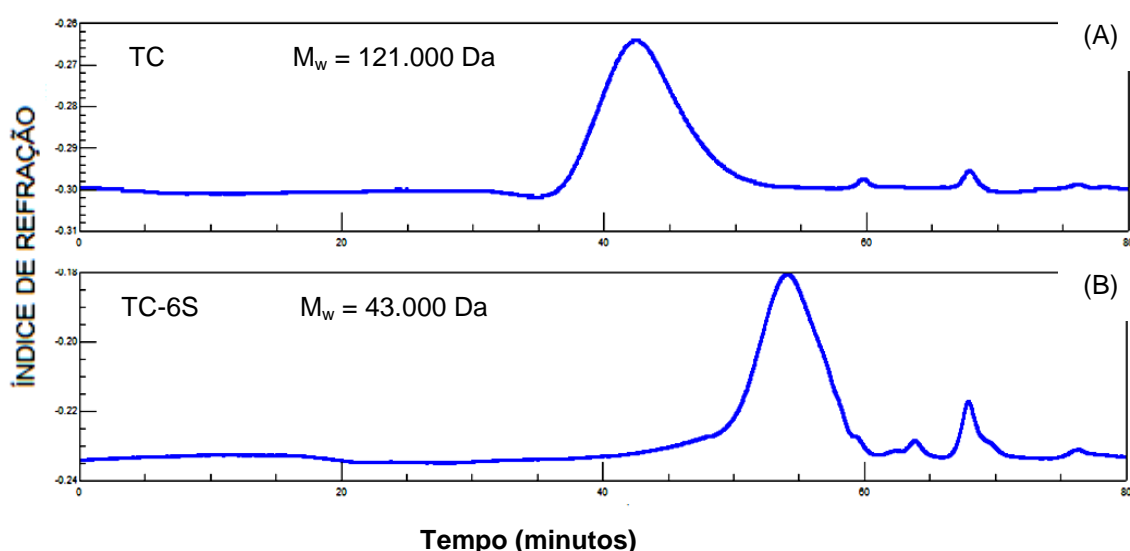
FRAÇÃO	DÍADES ^a	(%) ^b	DS ^c	M_w (Da)
TC-6S	G2S-DA2S	67	2,60	43.000
	G2S,6S-DA2S	33		

^a Os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al.* (1994); ^b estimada a partir da integração por RMN ^1H dos prótons anoméricos de cada díade; ^c metodologia descrita por Dodgson e Price (1964)

Assim como observado nas outras sulfatações realizadas, o perfil de eluição, determinado por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC)

acoplado a índice de refração, indica que houve quebra na cadeia polissacarídica, evidenciada pelo aumento no tempo de retenção da fração TC-6S quando comparada com a fração nativa (TC) e com a massa molecular (Figura 55).

FIGURA 55 - PERFIL DE ELUIÇÃO DETERMINADO POR HPSEC (ACOPLADO A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) E COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA DAS FRAÇÕES TC (A) E TC-6S (B)



Uma vez concluídas as etapas de extração, purificação e modificações químicas das carragenanas em estudo, as frações obtidas foram submetidas à atividade anticoagulante.

6.7 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO*

O potencial anticoagulante das frações modificadas quimicamente e das nativas foi determinado *in vitro* através do teste do tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT). Esse teste baseia-se na ativação do mecanismo intrínseco da coagulação através de um substituto plaquetário (cefalina), de um ativador do FXI

(cloreto de cálcio) e um fator de contato (caulim ou sílica). Diferentes concentrações dos polissacarídeos nativos e quimicamente modificados foram testadas.

A heparina, controle positivo do teste, apresentou atividade anticoagulante significativa a partir de 2 µg/mL de plasma, concentração suficiente para dobrar o tempo de coagulação obtido com a salina (30,8 s). Na concentração de 10 µg/mL de heparina houve inibição total da coagulação (>300 s).

Todas as frações nativas (K-01, IC e TC) apresentaram efeito anticoagulante, dose-dependente superior ao da salina (APTT = 30,8 s – Tabela 15). Isso pode ser justificado pela presença de grupamentos sulfato nestas moléculas. A fração K-01 apresentou um grau de sulfatação (DS) de 1,1 e as frações IC e TC 2,1. Alguns estudos com polissacarídeos quimicamente sulfatados demonstraram que moléculas nativas, desprovidas de grupos sulfato, não mostram atividade anticoagulante, indicando que estes grupos são essenciais para a atividade (CIPRIANI *et al.*, 2009; GRACHER *et al.*, 2010). O mesmo aconteceu com a fração KD (*kappa*-carragenana submetida à dessulfatação). Esta fração não foi capaz de prolongar o tempo normal de coagulação (Tabela 15).

TABELA 15 - ENSAIO DE APTT DAS FRAÇÕES NATIVAS (K-01, IC E TC) E MODIFICADAS QUIMICAMENTE (K-016S, K-01OS, K-01ES, KD, KD-6S, IC-6S E TC-6S)

FRAÇÃO	APTT (s)							DS ^a
	CONCENTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO (µg/mL de plasma)							
	10 µg	20 µg	30 µg	40 µg	50 µg	100 µg	150 µg	
K-01	36,2	33,8	35,8	36,9	44,9	52,6	56,7	1,1
K-016S	45,7	55,7	76,0	85,9	112,5	>300	>300	2,0
K-01OS	52,5	76,7	101,5	133,1	165,5	>300	>300	3,8
K-01ES	41,5	58,7	82,4	107,8	138,3	165,1	>300	3,2
KD ^b	31,4	30,4	30,3	30,1	30,3	30,7	34,7	0,1
KD-6S	30,6	31,7	30,6	30,5	30,9	33,3	31,1	0,6
IC	46,2	53,6	56,3	63,1	65,7	20,9	19,8	2,1
IC-6S	52,7	73,7	81,7	117,3	148,4	19,2	19,5	2,4
TC	34,5	39,0	43,2	49,3	54,7	80,3	93,0	2,1
TC-6S	38,2	48,7	54,2	65,8	86,7	147,8	>300	2,6

^a Grau de sulfatação (DS) determinado segundo Dodgson e Price (1962). ^b o DS de 0,1 corresponde à diáide G4S-DA presente em 22% na fração. Como controle negativo foi utilizada a salina (30,8 s) e como controle positivo foi utilizada a heparina não fracionada (202 UI/mg), APTT = 70,8 s na concentração de 2 µg/mL

A fração K-01 foi capaz de prolongar o tempo de coagulação a partir de 10 µg/mL, sendo que na dose máxima testada (150 µg/mL) o valor do APTT atingiu 56,7 s (1,8 vezes o valor obtido com a salina). A fração IC prolongou APTT a partir de 10 µg/mL (1,5 salina), mas somente até a concentração de 50 µg/mL, onde atingiu 65,7 s (2,1 vezes o valor obtido com a salina). Nas concentrações de 100 e 150 µg/mL essa fração exibiu atividade pró-coagulante, uma vez que os valores do APTT de 20,9 s e 19,9 s, respectivamente, se encontram abaixo daquele obtido com a salina. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Fonseca *et al.* (2008) para a galactana sulfatada da espécie *B. occidentalis*, que demonstrou potente atividade anticoagulante em baixas doses, mas com reversão do efeito em doses mais elevadas. A fração TC prolongou o ATPP em todas as concentrações testadas, com valores de 34,5 s (10 µg/mL) a 93,0 s (150 µg/mL), o que corresponde a 1,1 a 3,0 vezes o valor obtido com a salina, respectivamente. A fração TC apresentou o maior efeito anticoagulante entre as frações nativas.

Todas as frações modificadas quimicamente, exceto a KD, apresentaram efeito anticoagulante dose-dependente, superior à das frações nativas. A fração K-016S, constituída pelas díades G4S,6S-DA (55%), G4S-DA (17%), G4S,6S-DA2S/G4S-DA2S (18%) e G2S,4S,6S-DA2S (10%), prolongou o tempo normal de coagulação em 1,5 a 3,6 vezes, na faixa de concentração de 10 a 50 µg/mL, respectivamente, inibindo totalmente a coagulação a partir de 100 µg/mL de plasma.

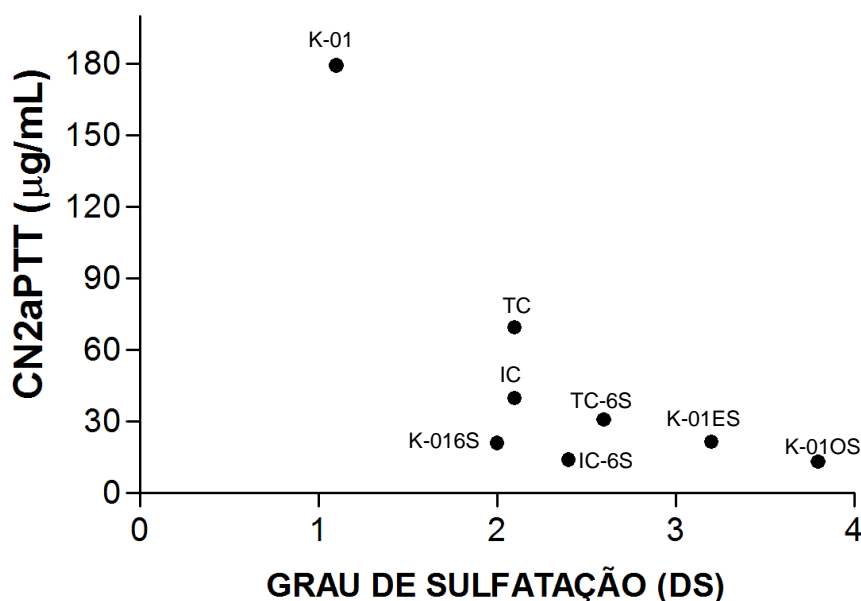
A fração K-01OS exibiu o maior efeito anticoagulante entre todas as frações, prolongando o APTT em 1,8 a 5,4 vezes o tempo normal entre as concentrações de 10 e 50 µg/mL, respectivamente, inibindo totalmente a coagulação a partir de 100 µg/mL de plasma. Essa fração é constituída principalmente pela díade G2S,4S,6S-DA2S (81%), mas também pela díade G4S,6S-DA2S (19%). A fração K-01ES prolongou o APTT em 1,3 a 5,4 vezes o tempo normal na faixa de concentração de 10 a 100 µg/mL, respectivamente, atingindo a inibição total em 150 µg/mL de plasma. Essa fração contém as díades G2S,4S-DA2S (40%), G4S-DA2S/G4S,6S-DA2S (6%) e G2S,4S,6S-DA2S (54%). A fração IC-6S (73% de G4S,6S-DA2S e 27% de G4S-DA2S), prolongou o APTT a partir de 10 µg/mL (1,7 vezes o valor obtido com a salina), mas somente até a concentração de 50 µg/mL, onde atingiu 148,4 s (4,8 vezes o valor obtido com a salina). Nas concentrações de 100 e 150 µg/mL, assim como a fração IC, da qual deriva, essa fração exibiu atividade pró-coagulante, uma vez que os valores do APTT de 19,2 s e 19,5 s, respectivamente,

se encontram abaixo daquele obtido com a salina. A fração TC-6S (67% de G2S-DA2S e 33% de G2S,6S-DA2S), na faixa de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$, prolongou o APTT normal em 1,2 a 4,8 vezes, respectivamente, extrapolando os 300 s na concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ de plasma.

De acordo com Mestechkhina e Shcherbukhin (2010), dentro da mesma classe de polissacarídeos, a atividade anticoagulante é influenciada pelos seguintes fatores: grau de sulfatação (DS), peso molecular e a distribuição de cargas ao longo da cadeia (posicionamento dos grupamentos sulfato).

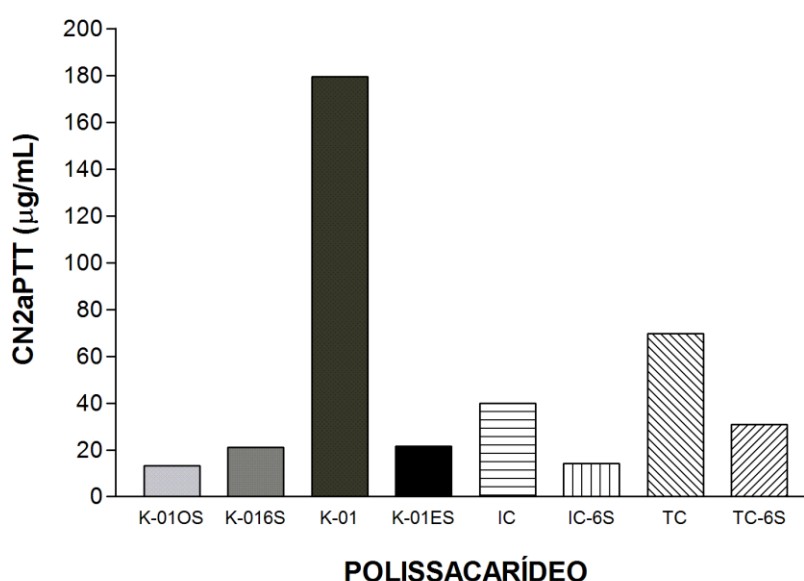
A figura 56 mostra a relação entre a CN2APTT e o grau de sulfatação (DS) das frações. A análise dos dados evidencia que a fração com maior DS (K-01OS) apresentou a melhor a atividade anticoagulante, enquanto que a fração com menor DS (K-01) teve o maior CN2APTT. Contudo, esse dado não permite fazer uma relação direta entre o DS e atividade, uma vez que a fração IC-6S, com DS de 2,4 e K-01OS com DS de 3,8 apresentaram praticamente o mesmo CN2APTT.

FIGURA 56 - CONCENTRAÇÃO NECESSÁRIA PARA DOBRAR O VALOR NORMAL DO APTT EM FUNÇÃO DO GRAU DE SULFATAÇÃO (DS)



Entre todas as frações testadas, K-01OS e IC-6S foram as que apresentaram o maior efeito anticoagulante. Isso é claramente observado na figura 57, onde é mostrada a concentração necessária para dobrar o valor normal do APTT (salina = 30,8 s). Esse valor é denominado de CN2APTT. Contudo, conforme já discutido, a fração IC-6S apresentou efeito pró-coagulante a partir de 100 µg/mL (Tabela 15). Efeito semelhante foi observado para a fração IC. Esta fração é constituída pela díade G4S-DA2S, enquanto que a IC-6S é constituída pelas díades G4S,6S-DA2S (73%) e G4S-DA2S (27%). Uma vez que o efeito anticoagulante de IC-6S é maior que o de IC (Figura 57), a sulfatação em C6 da unidade G4S parece ser responsável por esta diferença de atividade.

FIGURA 57 - CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO NECESSÁRIA PARA DOBRAR O VALOR NORMAL DO APTT (CN2APTT)
As frações KD e KD-6S não foram capazes de prolongar o tempo normal de coagulação (salina = 30,8 s)



Diferente de IC-6S, a fração K-01OS não apresentou efeito pró-coagulante. K-01OS é constituída pelas díades G2S,4S,6S-DA2S (81%) e G4S,6S-DA2S (19%). Isso sugere que a presença de sulfato em C2 de G4S,6S elimina o efeito pró-coagulante, sem afetar a potência do efeito anticoagulante, uma vez que K-01OS e

IC-6S apresentam praticamente a mesma CN2APTT (13,2 e 14,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; Figura 57).

Entre todas as frações, o menor efeito anticoagulante foi exibido por K-01, constituída pela díade G4S-DA. A fração IC, constituída pela díade G4S-DA2S, apresentou efeito anticoagulante 4,5 vezes superior a K-01. A diferença entre as díades dessas frações é um grupo sulfato ligado a C2 da unidade DA de IC, ausente em K-01. Esse grupo sulfato parece ser o responsável pela melhoria no efeito anticoagulante de IC. Uma vez que a fração K-016S, constituída majoritariamente pela díade G4S,6S-DA (55%) não apresentou efeito pró-coagulante, parece que a presença de sulfato em C2 da unidade DA é importante para esse efeito, observado em IC-6S. Como já descrito anteriormente, IC-6S e K-01OS apresentam uma CN2APTT muito semelhante, e a presença do grupo sulfato em C2 da unidade G4S elimina o efeito pró-coagulante observado em IC-6S, sem afetar a potência do efeito anticoagulante. Portanto, o aumento do efeito anticoagulante parece estar relacionado principalmente à sulfatação de C2 da unidade DA e do C6 da unidade G4S. Porém, o sulfato em C2 da unidade DA conduz a um efeito pró-coagulante em elevadas concentrações. Além disso, foi observado que a fração KD-6S, constituída por uma mistura de G-DA e G6S-DA não apresenta efeito anticoagulante (Tabela 15). Assim, a simples presença de C6 na unidade de β -D-galactopiranosose não torna a molécula ativa. Portanto, para se ter um grande efeito anticoagulante, sem efeito pró-coagulante, são necessários grupos sulfato adequadamente posicionados em C2, C4 e C6 da unidade de β -D-galactopiranosose e em C2 da unidade de 3,6- α -D-anidrogallactopiranosose, tal como em K-01OS.

A fração K-016S apresentou um efeito 8,5 vezes maior que K-01. Uma vez que K-016S apresenta 55% da díade G4S,6S-DA, a sulfatação em C6 da unidade G4S parece ser responsável pelo efeito anticoagulante. A fração K-01ES, constituída principalmente pela díade G2S,4S,6S-DA2S (54%), apresenta CN2APTT semelhante à K-016S (21,6 e 21,1 μg , respectivamente). Assim, o sulfato nas posições C2 de G4S e C2 de DA não provocam aumento na atividade anticoagulante. Contudo, se compararmos K-01ES e K-01OS, esta última apresenta 81% da díade persulfatada enquanto a primeira 54% e a atividade anticoagulante é ligeiramente potencializada (Figura 57). Estes resultados indicam que a presença de sulfato em C4 e C6 da unidade de G4S é importante para o efeito anticoagulante, como observado para a fração K-016S. E a sulfatação concomitante de C2 das

unidades G4S e DA aumentam apenas ligeiramente a atividade, como observado para K-01OS.

Com relação às frações TC (G2S-DA2S) e TC-6S (33% de G2S,6S-DA2S e 67% de G2S-DA2S), a sulfatação de C6 da unidade de G2S aumenta o efeito anticoagulante. Contudo, a presença da díade G4S,6S-DA parece ser mais importante para a atividade anticoagulante, quando se compara as CN2APTT das frações TC-6S e K-016S (30,9 e 21,1 µg/mL, respectivamente).

Portanto, o posicionamento dos grupos sulfato na molécula é mais importante do que a quantidade de sulfato.

7 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados, pode-se concluir que:

- As carragenanas nativas foram completamente caracterizadas com alto grau de pureza. A *kappa*-carragenana, obtida a partir da alga *Kappaphycus alvarezii* apresentou pureza acima de 90% após purificação por precipitação com KCl. A *iota*-carragenana, obtida a partir da alga *Eucheuma denticulatum* apresentou um grau de pureza maior que 95%, após tratamento alcalino da fração E. Os polissacarídeos obtidos a partir de alga *Gigartina skottsbergii* foram purificados com KCl para fornecer a fração G-08 composta principalmente por *lambda*-carragenana. G-08, após tratamento alcalino, forneceu a fração TC, que foi caracterizada e mostrou-se constituída principalmente por *theta*-carragenana;

- A otimização das reações de sulfatação da *kappa*-, *iota*- e *theta*-carragenana foi eficientemente monitorada utilizando análises de RMN ¹H;

- A fração K-01, constituída de *kappa*-carragenana, foi sulfatada seletivamente em C6 para fornecer a fração K-016S, composta pelas díades G4S,6S-DA (55%), G2S,4S,6S-DA2S (10%), G4S-DA (17%) e G4S-DA2S/G4S,6S-DA2S (18%);

- A persulfatação da fração K-01 forneceu a fração K-010S composta principalmente pela díade G2S,4S,6S-DA2S (81%). A utilização da *kappa*-carragenana na forma de sal de trietilamônio foi essencial para promover a sulfatação da carragenana em alto grau;

- A estratégia de proteção com o grupo pivaloíla foi eficiente em produzir a fração K-01E, que contém a díade G4S,6piv-DA. A sulfatação desta fração seguida da desproteção com álcali forneceu a fração K-01ES, que contém a díade trissulfatada G2S, 4S-DA2S (40% de rendimento);

- A solvólise da *kappa*-carragenana foi eficiente em produzir a fração KD contendo principalmente a díade G-DA (78%);

- A sulfatação seletiva em C6 da fração IC (*iota*-carragenana) foi alcançada utilizando o polímero na forma sódica. A fração IC-6S contém a díade G4S,6S-DA2S em aproximadamente 73%;

- A sulfatação seletiva da *theta*-carragenana foi alcançada apenas utilizando o polímero na forma de sal de trietilamônio. A díade foi identificada na fração TC-6S num rendimento moderado de 33%;

- Todas as frações modificadas quimicamente apresentaram atividade anticoagulante dose-dependente, superior à das frações nativas, exceto a KD que foi submetida a um processo de dessulfatação e não foi capaz de prolongar o ATPP normal;

- A fração K-010S exibiu o maior efeito anticoagulante entre todas as frações. Para se ter um grande efeito anticoagulante, sem efeito pró-coagulante, são necessários grupos sulfato adequadamente posicionados em C2, C4 e C6 da unidade de β -D-galactopiranosose e em C2 da unidade de 3,6- α -D-anidrogallactopiranosose.

REFERÊNCIAS

- AL-HORANI, R. A.; DESAI, U. R. Chemical sulfation of small molecules – advances and challenges. **Tetrahedron**, v. 66, p. 2907-2918, 2010.
- CAUGHEY, G. H. Building a better heparin. **Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 28 (2), p. 129-132, 2003.
- CEREZO, A.S. The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. et G. Part I. Studies on a fraction of *kappa*-carrageenan. **Journal of the Chemical Society, (C)**, p. 992-997, 1967.
- CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. Alkali modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota, mu/nu and *lambda*-series. **Carbohydr. Polym.**, v. 20, p. 95-98, 1993.
- CIPRIANI, T.R.; GRACHER, A.H.P.; SOUZA, L. M.; FONSECA, R.J.C.; BELMIRO, C.L.R.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. **Thromb. Haemost.**, v. 101 (5), p. 860-866, 2009.
- COHEN, M. The role of low-molecular-weight heparins in arterial diseases: optimizing antithrombotic therapy. **Thromb. Res.**, v. 100, p. 131-139, 2000.
- COLMAN, R. W. Are haemostasis and thrombosis two sides of the same coin? **J.Exp. Med.**, v. 203 (3), p. 493-495, 2006.
- DAHLBÄCK, B. Blood coagulation. **Lancet**, v. 355, p. 1627-1632, 2000.
- DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p. 1310-1312, 1964.
- DE RUITER, G.A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p. 389-395, 1997.
- DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Ed. Blücher, 2007.
- DINWOODEY, D.L.; ANSELL, J.E. Heparins, low-molecular-weight heparins, and pentasaccharides. **Clin. Geriatr. Med.**, v. 22, p. 1-15, 2006.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. **Biochem. J.**, v. 84 (1), p. 106-110, 1962.
- DUARTE, M. E. R.; CAUDURO, J. P.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; CEREZO A. S., The structure of the agar sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and

its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 335-347, 2004.

DUBOIS, M.K.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M.; CERESO, A.S. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 2575-2592, 2004.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A-P.; PEREIRA, S. P.; MOURÃO P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 275, n. 38, p.29299-29307, 2000

FONSECA, R. J. C.; OLIVEIRA, S. N. M. C. G.; MELO, F. R.; PEREIRA, M.G.; BENEVIDES, N. M. B.; MOURÃO, P. A. S. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thromb. Haemost.**, v. 99, p. 539-545, 2008.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Simpósio: HEMOSTASIA E TROMBOSE. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 229-237, jul./dez. 2001.

GAO, YING; FUKUDA, AKIKO; KATSURAYA, KANAME; KANEKO, YUTARO; MIMURA, TORU; NAKASHIMA, HIDEKI; URYU, TOSHIYUKI. Synthesis of Regioselective substituted curdulan sulfates with medium molecular weights and their specific anti-HIV-1 activities. **Macromolecules**, v. 30, p. 3224-3228, 1997.

GENTRY, P. A.; Comparative aspects of blood coagulation. **Vet. J.**, v. 168, p. 238-251, 2004.

GILBERT, E. E. **Sulfonation and related reactions**. New York: Interscience, 1965.

GONÇALVES, ALAN G.; DUCATTI, DIOGO R. B.; PARANHA, REINALDO G.; DUARTE, M. EUGÊNIA R.; NOSEDA, MIGUEL D. Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. **Carbohydr. Res.**, v. 340(13), p. 2123-2134, 2005.

GRACHER, A. H. P.; CIPRIANI, T. R.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Antithrombin and heparin cofactor II-mediated inactivation of α -thrombin by a synthetic, sulfated mannogalactan. **Thrombosis Research**, v. 126, p. 180-187, 2010.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2000. 640pp.

GUIBET, M.; KERVAREK, N.; GÉNICOT, S.; CHEVOLOT, Y.; HELBERT, W. Complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of *Gigartina skottsbergii* λ -carrageenan using carrabiose oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 1859-1869, 2006.

HIRSH J. Heparin. **N Engl J Med**, v. 324, p. 1565– 1574, 1991.

JIANG, L.; CHAN, T. Regioselective acylation of hexopyranosides with pivaloyl chloride. **Journal of Organic Chemistry**, v. 63, p. 6035-6038, 1998.

KNUTSEN, S.H.; MYLABODSKY, D.E.; LARSEN, B.; USOV, A.I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Botanica Marina**, v.37, p. 163-169, 1994.

KOLENDER, A.A.; MATULEWICZ, M.C. Desulfation of sulfated galactans with chlorotrimethylsilane. Characterization of β -carrageenan by ^1H NMR spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 1619-1629, 2004.

KRENTSEL, L.; CHAUBET, F.; REBROV, A.; CHAMPION, J.; ERMAKOV, I.; BITTOUN, P.; FERMANDJIAN, A.; PLATÉ, N.; JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant activity of functionalized dextrans. Structure analyses of carboxymethylated dextran and first Monte Carlo simulation. **Carbohydr. Pol.**, v. 33, p. 63-71, 1997.

LAM, L.H.; SILBERT, J.E.; ROSENBERG, R.D. The separation of active and inactive forms of heparin. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 69(2), p.570–577, 1976.

LEE, R.E. **Phycology**, 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 645pp.

LIAO, M.; CHIOVITTI, A.; MUNRO, S.L.A.; CRAIK, D.J.; KRAFT, G.; BACIC, A. Sulfated galactans from Australian specimens of the red alga *Phacelocarpus peperocarpus* (Gigartinales, Rhodophyta). **Carbohydr. Res.**, v. 296, p. 237-247, 1996.

LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J. R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

LINDAHL, U. L.; THUMBERG, G.; BACKSTROM, J.; RIESENFELD, K.; NORDLING, I.; BJORK, I. Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 259, n. 20, p. 12368-12376, 1984.

LIU, Y. H.; LIU, C. H.; TAN, H. N.; ZHAO, T.; CAO, J. C.; WANG, F. S. Sulfation of a polysaccharide obtained from *Phellinus ribis* and potential biological activities of the sulfated derivatives. **Carbohydr. Pol.**, v. 77, p. 370-375, 2009.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, p. 498-499, 1964.

MERLI, G. Diagnostic assessment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. **American Journal of Medicine**, v. 118 (8), p. 3-12, 2005.

MESTECHKINA, N.M.; SHCHERBUKHIN, V.D. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46 (3), p. 267-273, 2010.

MIDDELDORP, S. Heparin: From animal organ extract to design drug. **Tromb. Res.** v. 122, p. 753-762, 2008.

MINE, S.; YAMAZAKI, T.; MIYATA, T.; HARA, S.; KATO, H. Structural mechanism for heparin-binding of the third Kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor. **Biochemistry**, v. 41 (1), p. 78-85, 2002.

MOLLION, J.; MOREAU, S.; CHRISTIAEN, D. Isolation of a new type of carrageenan from *Rissoella verruculosa* (Bert.) J. Ag. (Rhodophyta, Gigartinales). **Botanica Marina**, v.29, p. 549-552, 1986.

MUELLER, R. L. First-generation agents: aspirin, heparin and cumarins. **Best Practice & Research Clinical Haematology**. v. 17, n. 1, p. 23-53, 2004.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; KAMATA, T. Solvolytic desulfation of glycosaminoglycuronan sulfates with dimethyl sulfoxide containing water or methanol. **Carbohydrate Research**, v. 58, p. 47-55, 1977.

NISHINO, T.; AIZU, Y.; NAGUMO, T. The influence of a fucan sulfate from the Brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. **Thromb. Res.**, v. 64, p. 723-731, 1991.

NORRIS, L. A.; Blood coagulation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 17, n. 3, p. 369-383, 2003.

NOSEDA, M. D. **Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetrasporofítica de *Gigartina skottisbergii* (Rhodophyta, Gigartinales)**. Tese de doutorado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. 173p, 1994.

OPOKU, G.; QIU, X.; DOCTOR, V. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of kappa carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 134-138, 2006.

PAINTER, T.J. In: Aspinall GO, editor. **The polysaccharides**. v.2, New York: Academic Press, 1983, p. 195.

PAPY-GARCIA, D.; BARBIER-CHASSEFIÈRE, V.; ROUET, V.; KERROS, M.; KLOCHENDLER, C.; TOURNAIRE, M.; BARRTAULT, D.; CARUELLE, J.; PETIT, E. Nondegradative Sulfation of polysaccharides. syntheses and structure characterization of biologically active heparan sulfate mimetics. **Macromolecules**, v. 38, p. 4647-4654, 2005.

PAULA, E.J.; PEREIRA, R.T.C.; OHNO, M. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii*, var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 111-121, 1999.

PEREIRA, L.; MESQUITA, J. F. Population studies and carrageenan properties of *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Journal Applied Phycology**, v.16 (5), p. 369-383, 2004.

PETIT, E.; PAPY-GARCIA, D.; MULLER, G.; COURTOIS, B.; CARUELLE, J.; COURTOIS, J. Controlled Sulfation of Natural Anionic Bacterial Polysaccharides Can Yield Agents with Specific Regenerating Activity *in vivo*. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 445-452, 2004.

PRADO-FERNÁNDEZ, J.; RODRÍGUEZ-VÁSQUEZ, J.A.; TOJO, E.; ANDRADE, J.M. Quantitation of κ -, ι - and λ -carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, p. 23-37, 2003.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 344-366, 2001.

REES, D. A. The carrageenan system of polysaccharides. Part I. The relation between the *kappa* and the *lambda* components. **Journal of Chemical Society**, p.1821-1832, 1963.

RICH, M.W. The management of venous thromboembolic disease in older adults. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.**, v. 59, p. 34 – 41, 2004.

ROMNEY, G.; GLICK, M. An updated concept of coagulation with clinical implications, **J. Amer. Dent. Assoc.**, v. 140, p. 567-574, 2009.

RORRER, G.L., CHENEY, D.P. Bioprocess engineering of cell and tissues cultures for marine seaweeds. **Acquacultural engineering**, v. 32, p.11-41, 2004.

SAHU, N.; MEENA, R.; GANESAN, M. Effect of grafting on the properties of *kappa*-carrageenan of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 584–592, 2011.

SILVA, F. R. F.; DORE, C. M. P. G.; MARQUES, C. T.; NASCIMENTO, M. S.; BENEVIDES, N. M. V.; ROCHA, H. A. O.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 26-33, 2010.

SOUTH, G.R.; WHITTICK, A. **Introduction to Phycology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987. 341pp

SOUZA M.C.R.; MARQUES, C.T.; DORE, C.M.G.; DA SILVA, F.R.F., ROCHA, H.A.O.; LEITE, E.L. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **J Appl Psychol**, v.19, p. 153–160, 2007.

TALARICO, L. B.; DUARTE, M. E. R.; ZIBETTI, R. G. M.; NOSEDA, M. D.; DAMONTE, E. B. An algal-derived DL-galactan hybrid is an efficient preventing agent for in vitro dengue virus infection. **Planta Medicat**, v. 73, p. 1464-1468, 2007.

THÀNH, T.T.T.; YASUNAGA, H.; TAKANO, R.; URAKAWA, H.; KAJIWARA, K. Molecular characteristics and gelling properties of carrageenan family 2. Tri-sulfated and tetra-sulfated carrageenans. **Polymer Bulletin**, v. 47, p. 305-312, 2001.

TOJO, E.; PRADO, J. A simple ^1H NMR method for the quantification of carrageenans in blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 325-329, 2003.

TOLLEFSEN, D. M. Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury, **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 27, p. 454-460, 2007.

USOV, A. I. NMR Spectroscopy of Red Seaweed Polysaccharides: Agars, Carrageenans, and Xylans. **Botanica Marina**, v. 27, p. 189-202, 1984.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, v.12, p. 301–308, 1998.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam v.13, p.73-92, 2002.

VAN DE VELDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H.S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 2309-2313, 2004.

VAN DE VELDE, F.; ROLLEMA, H. S. In: Graham A. Webb, editor. **Modern Magnetic Resonance – Part III: High Resolution NMR of Carrageenans**. The Netherlands: Springer, 2008, pp. 1605-1610.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. **ALGAE: An introduction to Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 627pp.

WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. Sulfation. **Methods Carbohydrate Chemistry**, v. 4, p. 297-298, 1964.

WUN, T. C.; KRETZMER, K. K.; GIRARD, J. P., MILETICH, G. J.; BROZE Jr., G. J. Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 6001-6004, 1988.

YANG, J. H.; DU, Y. M.; HUANG, R. H.; WAN, Y. Y.; LI, T. Y. Chemical modification, characterization and structure-anticoagulant activity relationships of Chinese Lacquer polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v 31, p. 55-62, 2002.

ZHANG, Z.; ZHANG, Q.; WANG, J.; SONG, H.; ZHANG, H.; NIU, X. Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 1124-1129, 2010.

ZHOU, G.F.; SHENG, W.X.; YAO, W.H. *et al.* Effect of low molecular lambda-carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. **Pharmacological Research**, v. 53 (2), p. 129-134, 2006.